

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique



LAVALEF



Département de Génie Chimique  
Laboratoire de Valorisation des Energies Fossiles

Mémoire de Projet de Fin d'Etudes  
Pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie Chimique

---

# Culture de microalgue verte halophile pour production de biodiesel

---

Réalisé par : Mohammed Nor Islam OUMSALEM  
Lyes ZANOUN

Sous la direction de : Mr R.BOUARAB  
Mr D.GHOBRINI

Pr  
MdR

Présenté et soutenu publiquement le :20/06/2019

## Composition du Jury :

Présidente	Mlle F.KIES	MCA	ENP
Promoteur	Mr R.BOUARAB	Pr	ENP
Promoteur	Mr D.GHOBRINI	MdR	URAER
Examinatrice	Mme S.SAHI	MCB	ENP
Examinatrice	Mme S.TOUAZI	MCB	ENP



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique



LAVALEF



Département de Génie Chimique  
Laboratoire de Valorisation des Energies Fossiles

Mémoire de Projet de Fin d'Etudes  
Pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie Chimique

---

# Culture de microalgue verte halophile pour production de biodiesel

---

Réalisé par : Mohammed Nor Islam OUMSALEM  
Lyes ZANOUN

Sous la direction de : Mr R.BOUARAB  
Mr D.GHOBRINI

Pr  
MdR

Présenté et soutenu publiquement le :20/06/2019

## Composition du Jury :

Présidente	Mlle F.KIES	MCA	ENP
Promoteur	Mr R.BOUARAB	Pr	ENP
Promoteur	Mr D.GHOBRINI	MdR	URAER
Examinatrice	Mme S.SAHI	MCB	ENP
Examinatrice	Mme S.TOUAZI	MCB	ENP

*A la mémoire de Nos parents  
de Nos êtres chers qui nous ont quittés  
de Nos familles  
de Nos camarades  
de Nos Enseignants*

...

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biotechnologie des microalgues (BM) de l'Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables (URÆER, Ghardaïa).

Nous remercions tout d'abord **Dieu** de nous avoir donné la volonté et le courage qui nous ont permis de réaliser ce travail.

Nous exprimons toute notre reconnaissance et notre gratitude à Monsieur **E. H. BENYOUSSEF** professeur au département de Génie Chimique et directeur du laboratoire de Valorisation des Énergies Fossiles de l'École Nationale Polytechnique pour son aide et ses précieux conseils qu'il nous a fournis pendant toute notre formation d'ingénieur.

Nos remerciements s'adressent également au Pr. **F. MOHELLEBI** chef du département de Génie Chimique pour nous avoir donné la chance et l'autorisation pour pouvoir réaliser ce projet de fin d'étude en externe.

Nous tenons à remercier particulièrement notre promoteur Monsieur **D. GHOBRI** Maître de Recherches à l'Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables (URÆER, Ghardaïa) de nous avoir accepté au Laboratoire de BM, proposé le sujet de notre projet de fin d'étude et de nous avoir donné l'opportunité de travailler au sein de son projet. Sa haute compétence, ses qualités humaines et ses conseils judicieux ont été pour nous une source inestimable de réconfort et d'encouragement pour l'accomplissement de ce travail. Nous le remercions pour avoir dirigé notre projet de fin d'étude et pour les longues journées passées à nous expliquer les rudiments de ce projet, pour avoir travaillé avec nous, pour l'interprétation de nos résultats et pour la rédaction de notre mémoire. Qu'il soit assuré pour tout cela de notre profonde reconnaissance et de notre profond respect.

Nous souhaitons aussi remercier M<sup>me</sup> **N. LAHOUEL** Chercheur à l'URÆER, Ghardaïa, pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire BM, pour ses conseils, sa disponibilité et pour toute l'aide qu'elle a pu nous apporter durant toute la période de projet.

Nous remercions sincèrement le Pr. **R. BOUARAB** pour avoir accepté d'encadrer ce projet de fin d'étude pour la partie de l'École Nationale Polytechnique. Nous avons beaucoup appris avec lui au cours de ces années de notre formation grâce à ses connaissances et à sa patience. Nous lui exprimons toute notre reconnaissance pour tout le soutien qu'il a pu nous apporter. Sa disponibilité et son aide nous ont été d'un grand apport dans l'accomplissement de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nous tenons à remercier Mlle **F. KIES**, maitre de conférences A au département de Génie Chimique à l'École Nationale Polytechnique, de nous avoir fait honneur de sa présence en qualité de présidente de jury d'évaluation de notre travail.

Nous remercions M<sup>me</sup> **S.SAHI**, maitre de conférences B et M<sup>me</sup> **S.TOUAZI**, maitre de conférences B d'avoir pris le temps et la patience d'examiner le présent travail et pour toutes leurs remarques qui aideront à améliorer notre modeste contribution à la bibliothèque de l'École Nationale Polytechnique.

*Nous tenons à remercier également l'ensemble des enseignants du département de Génie Chimique pour leur dévouement, pour nous avoir conseillé, orienté et soutenu et surtout pour l'enseignement de qualité dont ils nous ont fait par durant ces trois dernières années.*

*Nous tenons à témoigner notre reconnaissance, à Mlle **R. BENOUGHLIS**, technicienne au sein du département de Génie Chimique de l'École Nationale Polytechnique.*

*Enfin, un très grand merci à nos familles pour leurs conseils et leur support financier, moral et intellectuel tout au long de nos études qui nous ont toujours soutenus et poussés vers l'avant dans nos choix pour réaliser ce double diplôme. Sans eux tout aurait été beaucoup plus difficile.*

## زراعة الطحالب المجهرية الخضراء في وسط عضوي من أجل إنتاج الوقود الحيوي

**ملخص:** خدم الوقود الناتج من الطاقة الغير المتجددة البشر بشكل جيد لفترة طويلة، ومع ذلك، لا يزال مستنفد وملوث. الطحالب المجهرية تبدو بديلاً لهذا الوقود من خلال إنتاج الوقود الحيوي، وهذه النباتات المجهرية لديها إمكانية زراعتها بطرق مختلفة لإنتاج الوقود الحيوي. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم إنتاج الكتلة الحيوية والدهون لسلسلة من كلوريليا في حالة وسط عضوي. أظهرت النتائج أن استخدام مصلى اللبن يمكن أن يحل محل استخدام وسط اصطناعي مثل BG11 لزراعة سلالة كلوريليا معزولة محلياً. في الواقع، فإن إضافة مصدر من الأزوت والمغنيسيوم إلى مصلى اللبن، سواء تم تحليله أم لا، زاد من إنتاج الكتلة الحيوية وبشكل ملحوظ، 0,0367 غ / ساعة و 0,037 غ / ساعة، على التوالي بالمقارنة مع وسط BG11 حيث كان التركيز 0,033 غ / ساعة. من جهة أخرى، تكون كمية الدهون المنتجة أفضل في الحالة التي يستكمل فيها مصلى اللبن بالأزوت والمغنيسيوم وتكون أعلى في المتوسط من 26 % من الكتلة الحيوية الطحلبية المنتجة.

**الكلمات الدالة:** كلوريليا فولجارييس، الوقود الحيوي، وسط عضوي، مصلى اللبن، الجنوب الجزائري.

## Culture of halophilic green microalgae for biodiesel production

**Abstract:** Fossil fuels have served humans well for a long time, however, they remain exhaustible and polluting. Microalgae seem to be an alternative to fossil fuels through biofuel production, these microscopic plants have the opportunity to be grown in different ways to produce biofuel. The objective of this study was to evaluate the biomass and lipid productivity of a strain of *Chlorella* in a heterotrophic condition. The results showed that the use of whey can replace the use of a synthetic medium such as BG11 for the cultivation of the locally isolated *Chlorella* strain. In fact, the addition of nitrogen and magnesium to the whey, whether hydrolysed or not, increased the yield of biomass significantly, respectively, 0,0367 g/h and 0,037 g/h, compared to the BG11 medium where the productivity was 0,033 g/h. In addition, the amount of lipid produced is better in the case where the whey is supplemented with nitrogen and magnesium and it exceeds on average 26% of the algal biomass produced.

**Key words:** *Chlorella vulgaris*, biodiesel, heterotrophy, whey, southern Algeria.

## Culture de microalgue verte halophile pour production de biodiesel

**Résumé :** Les carburants fossiles ont bien servi l'être humain depuis longtemps, cependant, ils restent épuisables et polluants. Les microalgues semblent être une alternative aux carburants fossiles par la production biocarburants, ces végétaux microscopiques ont la possibilité d'être cultivés de différentes manières afin de produire du biocarburant. Le présent travail avait pour objectif d'évaluer la biomasse et la productivité lipidique d'une souche de chlorelle en condition hétérotrophe. Les résultats ont montré que l'utilisation du lactosérum peut remplacer l'usage d'un milieu de synthèse comme le BG11 pour la culture de la souche de chlorelle localement isolée. En effet, l'addition d'une source d'azote et du magnésium au lactosérum, qu'il soit hydrolysé ou non, a augmenté le rendement en biomasse et de façon significative, respectivement 0,0367 g/h et 0,037 g/h comparativement au milieu BG11 où la concentration était de 0,033 g/h. Par ailleurs, la quantité de lipide produite est meilleure dans le cas où le lactosérum est additionné d'azote et du magnésium et elle est supérieur en moyenne à 26 % de la biomasse algale produite.

**Mots clés :** *Chlorella vulgaris*, biodiesel, hétérotrophie, lactosérum, sud algérien.

# TABLE DES MATIÈRES

## LISTE DES TABLEAUX

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES ACRONYMES ET ABRÉVIATIONS

<b>INTRODUCTION</b> .....	14
<b>Partie 1 : Synthèse bibliographique</b> .....	17
<b>Chapitre 1 : Généralités</b> .....	18
1.1 La biomasse, une source d'énergie alternative aux ressources fossiles .....	19
1.2 Caractéristiques de biodiesel .....	22
1.3 Les normes de biodiesel .....	23
<b>Chapitre 2 : Les microalgues</b> .....	25
2.1 Généralités sur les microalgues .....	26
2.2 Classification des algues .....	27
2.3 Reproduction des microalgues .....	27
2.4 Métabolisme algal .....	28
2.5 Composition biochimique des microalgues.....	28
2.6 Teneurs en lipides des microalgues.....	30
2.7 Mode de culture des microalgues .....	30
2.7.1 Culture en batch .....	30
2.7.2 Culture continu .....	31
2.8 Mode hétérotrophe .....	31
2.9 Conditions de culture des microalgues .....	32
2.10 Les sources de carbone organiques : glucose et alternatives .....	33
2.11 Récolte des algues .....	33
2.12 Extraction des lipides chez les microalgues .....	34
2.13 Réaction de Transestérification .....	36
2.14 Autres voies d'applications .....	37
2.14.1 Bioéthanol .....	38
2.14.2 Biohydrogène .....	38
<b>Chapitre 3 : Lactosérum</b> .....	39
3.1 Généralités .....	40
3.2 Valeur nutritionnelle .....	42
3.2.1 Lactose .....	42
3.2.2 Protéines .....	42
3.3 Quantités produites et charge polluante .....	43
3.4 Valorisation du lactosérum .....	43
3.4.1 Alimentation humaine .....	44
3.4.2 Alimentation animale .....	45
3.4.3 Domaine biotechnologique .....	45



<b>Partie 2 : partie expérimentale</b> .....	46
<b>Chapitre 4 : Matériels et méthodes</b> .....	47
4.1 Prélèvement et méthode d'échantillonnage .....	48
4.1.1 Prélèvement de microalgues .....	48
4.1.2 Analyse physicochimique de l'eau collectée .....	48
4.1.3 Identification et caractérisation des espèces microalgales dans les échantillons prélevés .....	48
4.2 Identification, Isolement et purification des souches de la <i>Chlorella vulgaris</i> .....	48
4.3 Milieu de culture utilisé pour l'isolation de la souche de chlorelle.....	49
4.3.1 Composition chimique du milieu BG11 .....	50
4.3.2 Préparation de solutions mères. ....	50
4.3.3 Préparation de milieu de culture gélosé pour des boîtes de Pétri .....	51
4.3.4 L'inoculation .....	51
4.4 La Culture de la souche de <i>Chlorella vulgaris</i> localement isolée en mode hétérotrophe...	52
4.4.1 Conditions de travail .....	52
4.4.2 Etude du comportement de la souche <i>C. vulgaris</i> localement isolée .....	52
4.4.3 Préparation de la culture mère (préculture) .....	52
4.5 Préparation du lactosérum pour la culture algale .....	53
4.6 Détermination de taux de glucose .....	53
4.7 Culture de la souche jaune de <i>Chlorella vulgaris</i> localement isolée .....	54
4.7.1 Cinétique de croissance de la souche jaune de <i>C. vulgaris</i> par la méthode gravimétrique .....	55
4.7.2 Mesure du pH et du taux de glucose .....	55
4.8 Récolte, Extraction et Transestérification .....	55
4.8.1 Récolte .....	55
4.8.2 Extraction .....	56
4.8.3 Transestérification .....	58
<b>Chapitre 5 : Résultats et discussion</b> .....	59
5.1 Répartitions et isolement des souches de microalgues .....	60
5.2 Analyse physicochimique des eaux .....	60
5.3 Répartition et prolifération des microalgues .....	60
5.4 Principales espèces de microalgues identifiées .....	61
5.5 Développement de la souche <i>Chlorella vulgaris</i> G12 sur BG11 et le lactosérum .....	62
5.6 Evolution des sucres .....	63
5.7 Effet du pH .....	64
5.8 Calcul de productivité .....	65
5.9 Séchage en étuve et séchoir solaire indirect pour la biomasse produite.....	66
5.10 Extraction des lipides .....	67
5.11 Transestérification et caractéristiques du biodiesel produit .....	69

<b>CONCLUSIONS ET PERPECTIVES</b> .....	70
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	73
<b>WEBOGRAPHIE</b> .....	84

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Les cultures à huile .....	21
Tableau 1.2 : Propriétés physicochimiques de biodiesel de microalgues, du petro-diesel et de biodiesel .....	23
Tableau 1.3 : Propriétés de biodiesel issu de microalgues selon la norme EN14214.....	24
Tableau 1.4 : Propriétés de biodiesel issu de microalgues selon la norme ASTM .....	24
Tableau 1.5 : Propriétés de biodiesel issu de microalgues selon la norme ASTM catégorie S15 .....	24
Tableau 2.1 : Taux de croissance de diverses espèces de microalgues et de cyanobactéries ainsi leur temps de doublement correspondant .....	26
Tableau 2.2 : Modes trophiques utilisés par les microalgues .....	28
Tableau 2.3 : Compositions biochimiques de microalgues .....	29
Tableau 3.1 : Différents types de lactosérum .....	40
Tableau 3.2 : Composition générale de lactosérum doux et acide .....	41
Tableau 3.3 : Application des protéines du lactosérum .....	44
Tableau 4.1 : Composition des solutions mères microéléments I et II .....	50
Tableau 4.2 : Composition globale du milieu de culture .....	50
Tableau 4.3 : Composition des solutions mères utilisées pour préparer le milieu final .....	51
Tableau 4.4 : Milieux de culture utilisés pour l'étude de la cinétique de croissance de <i>C. vulgaris</i> (couleur jaune) .....	54
Tableau 5.1 : Caractéristiques physicochimiques des eaux de prélèvement de <i>Metilli</i> .....	60
Tableau 5.2 : Productivité de la souche <i>C. vulgaris</i> G12 dans les milieux testés .....	65
Tableau 5.3 : Lipides extraits pour les différents milieux .....	67
Tableau 5.4 : Caractéristiques du biodiesel obtenu .....	69

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Sources d'énergie mondiale .....	19
Figure 1.2 : Classification des biocarburants) .....	20
Figure 1.3 : Etapes de production de biodiesel à partir de microalgues .....	22
Figure 2.1 : Quelques microalgues .....	26
Figure 2.2 : Différentes formes de microalgues .....	27
Figure 2.3 : Reproduction sexuée et asexuée chez Chlamydomonas .....	27
Figure 2.4 : Structure chimique d'un triacylglycérol et d'un phospholipide .....	29
Figure 2.5 : Courbe de croissance théorique de microalgues .....	30
Figure 2.6 : Fermenteur expérimental de 3 m <sup>3</sup> .....	32
Figure 2.7 : Un triglycéride et un phospholipide .....	34
Figure 2.8 : Paliers de détermination du profil lipidique d'un extrait lipidique total .....	35
Figure 2.9 : Réaction de transestérification d'un triglycéride .....	36
Figure 2.10 : Réaction de transestérification .....	36
Figure 2.11 : Principales voies de valorisation des microalgues .....	37
Figure 3.1 : Coagulation du lait .....	40
Figure 3.2 : Structure moléculaire du lactose .....	42
Figure 3.3 : Différents procédés de valorisation de lactosérum .....	44
Figure 4.1 : Microscope .....	49
Figure 4.2 : Isolement des microalgues dans des boîtes de Pétri .....	49
Figure 4.3 : Stérilisation du milieu de culture .....	51
Figure 4.4 : Isolation des souches de Chlorelle en culture dans des boîtes de Pétri .....	52
Figure 4.5 : Agitateur orbitale .....	53
Figure 4.6 : Réfractomètre .....	53
Figure 4.7 : Milieux de culture utilisés .....	54
Figure 4.8 : Séchoir solaire indirect avec chicanes .....	56
Figure 4.9 : Protocole d'extraction des lipides à partir des microalgues .....	56
Figure 4.10 : Evaporation du solvant .....	57

Figure 5.1 : Micrographie de l’algue présente dans nos échantillons (Gx20, image de gauche) Colonies de couleurs jaune et jaune orangé de l’algue (image de droite) .....	60
Figure 5.2 : Colonies de couleurs vertes sur le milieu BG11 seul .....	61
Figure 5.3 : Purification des souches de <i>Chlorella</i> sur milieu BG11.....	61
Figure 5.4 : Micrographie de <i>Chlorella vulgaris</i> G12 localement isolée .....	62
Figure 5.5 : Evolution de la biomasse dans les différents milieux étudiés .....	63
Figure 5.6 : Courbe d'étalonnage pour la détermination de taux du glucose (g/L) .....	63
Figure 5.7 : Evolution de l’assimilation du glucose .....	64
Figure 5.8 : Evolution du pH .....	65
Figure 5.9 : Résultats de séchage assisté par l’étuve .....	66
Figure 5.10 : Résultats de séchoir solaire indirect .....	66

## LISTE DES ACRONYMS ET ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGPI: Acides Gras Poly-Insaturés

APG: Alkylpolyglucoside

ASTM: American Society for Testing and Materials

ATP: Adénosine Triphosphate

BG11: Blue Green

CD : Conjugated Diene (Diène Conjugué)

COD : Carbone Organique Dissous

CO<sub>2</sub>: Dioxyde de Carbone

C<sub>3</sub>P : Triose-Phosphates

C<sub>5</sub>P : Pentose-Phosphates

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> : Glucose

CRBM : Centre de Recherche en Biologie Cellulaire de Montpellier

DBO : Demande Biochimique Enoxigène

DCO : Demande Chimique en Oxygène

EIA: Energy Information Administration

EN: European Norm

FAME : Fatty Acids Methyl Esters (esters méthyliques d'acides gras)

FAO: Food and Agriculture Organization

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Déshydrogénase

GL : Glycolipide

GLA : Acideγ-Linolénique

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IC : Indice de Cétane

IFP : Institut Français du Pétrole

kT : kilo Tonnes

LGPM : Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux

MAG : Monoacylglycérol

mL : millilitre

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NREL : National Renewable Energy Laboratory

PBR : Photos Bioréacteurs

PE : Point d'Écoulement

Pe : Point d'éclair

PGK : Phosphoglycérokinase

pH : Potentiel D'hydrogène

PL : Phospholipides

ppm : partie par million

PT : Point de Trouble

RUBP : Ribulose Biphosphate

Rubisco : Ribulose Bis Phosphate Carboxylase Oxygénase

SCP : Single Cell Protein

TAG : Triacylglycérol

TBT : Tributylétain

TDS : Temps De Séjour

trm : tours par minute

UF : Ultrafiltration

URAER : Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables

UV : Ultraviolet

SWW : Saline West Water

# **Introduction**



L'augmentation de la consommation du pétrole, principale source d'énergie fossile actuelle, utilisée en grande partie par le secteur du transport, fait en sorte que ses réserves risquent de diminuer dans un futur proche. Ainsi, la dépendance des pays consommateurs vis-à-vis des pays producteurs ne fera que s'accroître. Par ailleurs, les transports sont considérés comme la première source d'émissions de gaz à effet de serre (GES) dont le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), gaz lié aux changements climatiques (Chamoumi, 2013). Ces facteurs ainsi que l'instabilité des cours du pétrole ont incité les politiques et par conséquent les chercheurs à trouver, de façon urgente, des sources alternatives au pétrole.

Les principales alternatives au pétrole pour les transports sont liées à l'électricité, aux gaz ou aux biocarburants. Ces derniers issus de la biomasse, ils sont classés en trois générations. La troisième génération tente de s'affranchir du sol via l'utilisation de micro-organismes qui sont les microalgues. Déjà utilisées dans l'alimentaire, les cosmétiques et les fertilisants.

Les microalgues sont une source importante en biomasse, ce sont des microorganismes photosynthétiques qui attirent l'attention des scientifiques et des industriels en raison de leurs nombreuses potentialités (Michaud, 2016). La principale concerne la production des métabolites d'intérêt thérapeutique ou industriel tels les acides gras polyinsaturés à grande chaîne (AGPI), les pigments, les polysaccharides, les vitamines ou divers composés biologiquement actifs. En effet, les microalgues peuvent aussi être utilisées pour la protection de l'environnement en utilisant leur capacité à fixer le dioxyde de carbone et certains métaux lourds lors de leur croissance (traitement des eaux usées, réduction des gaz à effet de serre) et à produire de l'énergie sans dégagement de gaz à effet de serre (Michaud, 2016).

*Chlorella vulgaris* est une microalgue verte qui a la capacité de produire des composés ayant un potentiel énergétique comme les lipides (source de biodiesel). En effet, par sa division cellulaire rapide (temps de duplication de 8.8h) et son pouvoir à accumuler des lipides jusqu'à 32 % de son poids sec, cette microalgue attire l'attention de plusieurs laboratoires dans le monde au point de devenir une espèce modèle (Ghobrini et al., 2019).

Selon les experts, le frein majeur de la troisième génération de biocarburant est son coût. En effet, les «algocarburants» ne sont pas encore assez compétitifs pour rivaliser avec les carburants traditionnels. Cependant, le secteur fait l'objet de nombreuses études afin d'améliorer ce point négatif et de trouver des moyens qui diminuent le coût de la culture algale (Michaud, 2016).

En Algérie, 13860 tonnes de lactosérum est produite par an. Il est le principal produit secondaire obtenu lors de la fabrication du fromage (Site web [1]). Ce qui fait de lui un milieu très riche en nutriments (Gonzalez, 1996). Ce coproduit est l'un des rejets industriels les plus polluants dans l'industrie laitière. En effet, un déversement direct du lactosérum dans les cours d'eau (rivières, fleuves, etc.) génère une diminution du contenu en

oxygène dissous, des problèmes d'eutrophisation et de toxicité modifiant les propriétés physico-chimiques des écosystèmes aquatiques (Arevalo, 2017).

Selon Baldasso et *al.*, (2011), seulement la moitié du lactosérum est valorisé dans le monde ce qui exige de trouver des solutions simples et économiques pour la valorisation de ce coproduit. En Algérie, la valorisation du lactosérum est à son balbutiement pour ne pas dire absente (Ghobrini et *al.*, 2017). Ainsi, les champs de son utilisation restent larges tels que l'usage agricole (nutrition animale, compost et dépollution), usage alimentaire (alimentation générale, compléments alimentaires) ainsi que son utilisation dans la valorisation énergétique.

L'objet de ce mémoire est de montrer l'intérêt des microalgues comme alternative aux carburants fossiles, par la valorisation et l'utilisation du lactosérum comme support de culture d'une microalgue du genre *Chlorella* localement isolée.

Ce mémoire comportera les chapitres suivants :

❖ Chapitre 1 : Généralités

Ce chapitre présente une généralité sur la situation actuelle des énergies fossiles ainsi que les différentes sources d'énergies alternatives, l'intérêt de la biomasse, les biocarburants et les différentes caractéristiques et normes du biodiesel.

❖ Chapitre 2 : Microalgues

Ce chapitre est une étude bibliographique concernant les microalgues, la classification, métabolisme algale, mode de nutrition, les conditions et mode de culture ainsi que les différentes applications commerciales des microalgues.

❖ Chapitre 3 : Lactosérum

Ce chapitre se veut une revue des connaissances sur le lactosérum, la quantités produites et charge polluante ainsi que sa valorisation.

❖ Chapitre 4 : Matériels et méthodes

Ce chapitre est relatif à la description du matériel et des méthodes expérimentales ayant permis la réalisation pratique de cette étude.

❖ Chapitre 5 : Résultats et discussions

Ce chapitre est consacré à la présentation de nos résultats expérimentaux et leurs discussions.

❖ Conclusions et perspectives

Cette partie permet de tirer un bilan global des différents travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire. De même, des perspectives de recherche sont proposées pour la continuité des travaux.

# **Partie 1**

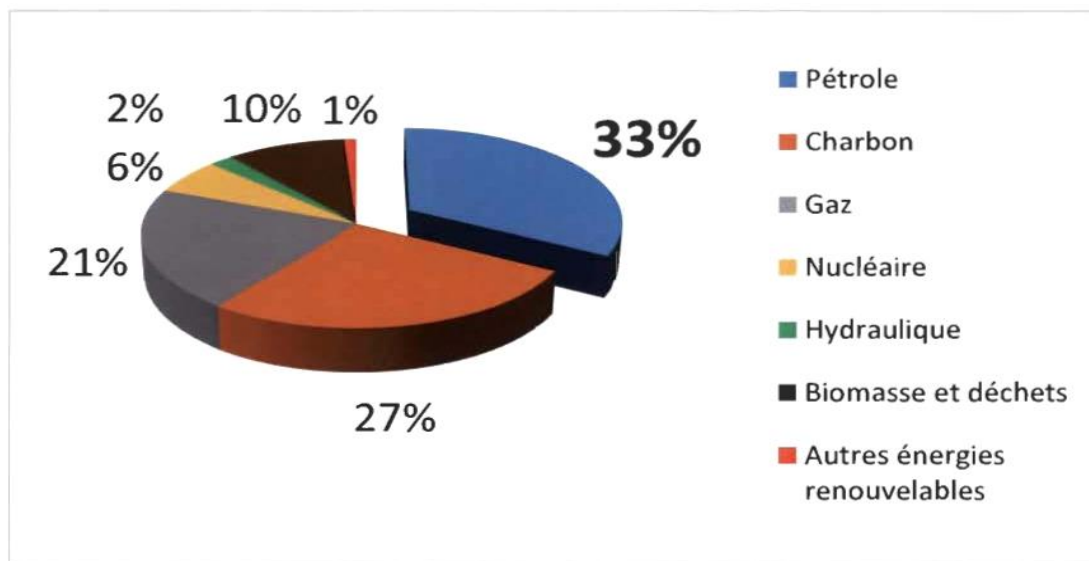
## **Synthèse bibliographique**

# **Chapitre 1**

## **Généralités**

## 1.1 La biomasse, une source d'énergie alternative aux ressources fossiles

A l'heure actuelle les ressources fossiles que sont le pétrole, le charbon et le gaz représentent la majorité de l'énergie utilisée dans le monde. Elles sont principalement utilisées dans des domaines comme le transport, l'industrie ou encore l'alimentation. En termes de chiffres, les énergies fossiles représentent 81 % de l'énergie mondiale dont 33 % pour le pétrole (figure 1.1) (Shafiee et Topal, 2009). Alors que la biomasse et les énergies renouvelables (solaire, éolien, géothermie ...) ne représentent que 11 % de l'énergie globale.



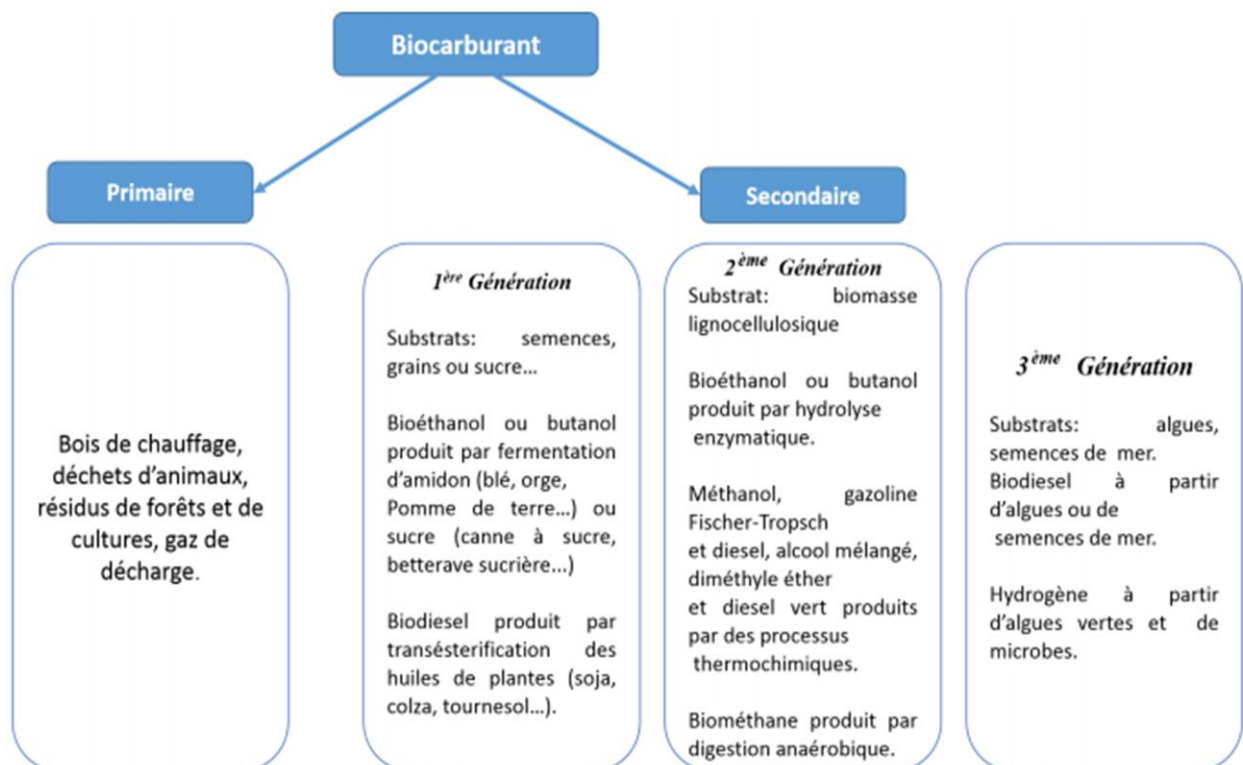
**Figure 1.1 :** Sources d'énergie mondiale (Shafiee et Topal, 2009)

Depuis les cent dernières années, l'importante expansion de la croissance démographique et de l'économie de plusieurs pays a été accompagnée par une augmentation de la consommation des combustibles fossiles et une dépendance face à ces ressources. En effet, en 2006, la consommation mondiale de pétrole était chiffrée à environ 85 millions de barils par jour, dont environ 50 % de la consommation de carburants liquides provenait du secteur des transports (*Energy Information Administration (EIA)*, 2009). L'EIA prévoit d'ailleurs que cette consommation mondiale aura atteint 106,6 millions de barils par jour en 2030 et que le secteur des transports serait alors responsable de 80 % de cette augmentation (EIA, 2009). La surconsommation de carburants liquides, comme l'essence et le diesel, s'explique par le fait que ce secteur dépend à 97 % du pétrole et que, pour le moment, les solutions alternatives actuellement envisagées ne permettent pas une substitution importante et rapide du pétrole (Institut Français du Pétrole (IFP), 2008).

Le fractionnement hydraulique pour l'exploitation du gaz de schiste ou encore l'utilisation des sables bitumineux en sont des exemples. Les réserves de pétrole tendent à

disparaître avec le temps alors que la demande en carburant est présente et ne cesse d'augmenter. En effet, rien qu'en 2015 il y avait plus de 1.2 milliard de voitures dans le monde (Site web [2]). Par ailleurs, l'exploitation des ressources fossiles présente des problèmes environnementaux, notamment avec la pollution qu'elle engendre. Elle est impliquée dans l'accélération du réchauffement climatique par la production de gaz à effet de serre.

Devant ces divers enjeux énergétiques, économiques et écologiques, de nouvelles technologies renouvelables et non-génératrices de gaz à effet de serre sont étudiées. Les biocarburants issus de la biomasse peuvent être une alternative aux énergies fossiles. Ils sont classés en trois générations : la première génération utilise comme source de biomasse les cultures qui sont traditionnellement destinées à l'alimentation, par exemple le maïs, la canne à sucre ou encore les céréales. Le substrat de départ pour la seconde génération est la biomasse ligno-cellulosique comme les résidus forestiers ou agricoles. La troisième génération tente de s'affranchir du sol via l'utilisation de micro-organismes (figure 1.2).



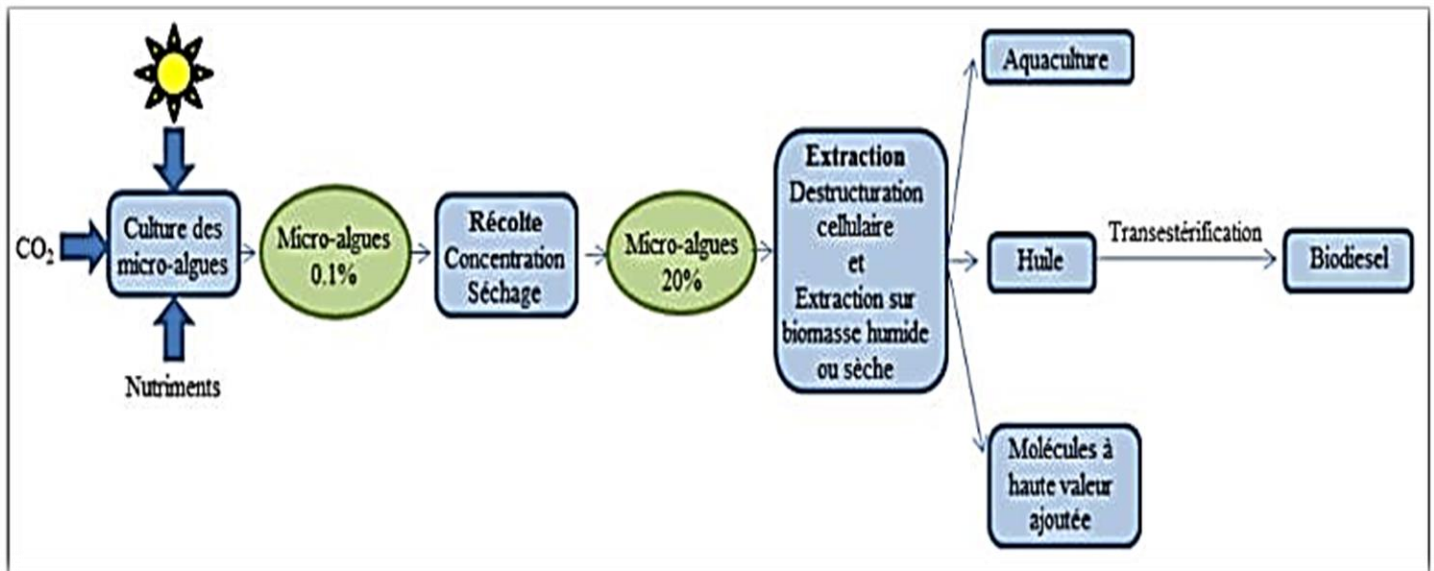
**Figure 1.2** : Classification des biocarburants selon Nigam et Singh (2011)

Nous nous intéressons ici à la 3<sup>ème</sup> génération de biocarburants et plus particulièrement aux microalgues, car la culture de ces dernières est actuellement en plein essor. En effet, la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération d'agrocultures utilisent des terres arables, engendrent de la déforestation et augmentent la consommation d'eau et le prix des denrées alimentaires. Ces biocarburants augmentent aussi la pollution du fait de l'utilisation de pesticides et d'engins agricoles afin d'augmenter leur productivité. Ces différents problèmes ne s'appliquent pas à la 3<sup>ème</sup> génération de biocarburants. Ainsi, plusieurs avantages découlent de la 3<sup>ème</sup> génération comme une capacité de production de biomasse plus importante et des fréquences de récoltes plus élevées. Par ailleurs, les microalgues présentent une bonne adaptation aux changements de milieu et contrairement aux plantes terrestres, elles ont un taux de croissance beaucoup plus élevé. En effet, certaines espèces sont capables de doubler leur croissance en 3,5 heures (Mata et al., 2010 ; Demirbas et Demirbas, 2010). De plus, leur production est continue sur toute l'année car elles ne dépendent pas des saisons. En outre, ils accumulent des quantités d'huiles supérieures comparativement aux meilleures plantes terrestres jusqu'à 70 % de leur poids sec pour certaines espèces (tableau 1.1).

**Tableau 1.1** : Les cultures à huile selon Li Y., et al., (2010)

	Colza	Huile de palme	Microalgue
Productivité en lipides (T.ha <sup>-1</sup> .an <sup>-1</sup> )	0.5-0.6	4-7	40-60

En 2006, Xu et al., estimaient la production de biodiesel algal à plus de 0,50\$ le litre contre 0,35\$ le litre pour le diesel fossile. Satyanarayama et al., estiment en 2011 le cout de production de biodiesel algale à 2,80\$ le litre alors que le diesel est à 0,49\$. En 2014, Quinn et al., ont donné une palette de prix pour le biodiesel algale. Ce dernier est de 1,64\$ à plus de 30\$ par gallon soit de 0,43\$ à plus de 7,92\$ le litre (Mata et al., 2010). Ces amplitudes de prix entre les différents auteurs s'expliquent par la variation de productivité en huile des microalgues ainsi que par la variation des méthodes utilisées lors de la production de carburant. La production de biodiesel comporte différentes étapes comme la culture, la récolte, l'extraction des huiles et leur conversion en biocarburant (Abert Vian et al., 2013), (figure 1.3).



**Figure 1.3 :** Etapes de production de biodiesel à partir de microalgues selon Abert Vian et al..(2013).

Afin de diminuer le coût de production des algocarburants plusieurs solutions sont étudiées comme l'utilisation de lactosérum issu de la coagulation des caséines dans l'industrie laitière, ce milieu est très riche en nutriments. Un autre moyen de diminuer le coût de la culture algale est le dioxyde de carbone provenant d'effluents gazeux. Le dioxyde de carbone, qui est le substrat de la photosynthèse, est utilisé par les algues comme source de carbone. Utiliser le dioxyde de carbone des usines permet de réduire la quantité de gaz à effet de serre émis dans l'atmosphère par les industries. Notons également que certains rejets industriels comme des lixiviats de sites d'enfouissement de déchets municipaux contenant des nutriments peuvent être utilisés dans la culture des microalgues (Michaud, 2016).

Il est important de constater qu'il y a d'autres voies de valorisation énergétique possible avec les microalgues. En effet il est possible de produire du bioéthanol par fermentation des sucres algaux. Les algues peuvent également produire de l'hydrogène pouvant être utilisé par la suite dans des piles à combustible ou encore pour produire de l'électricité. La production de méthane via le processus de méthanisation par la digestion anaérobie est envisageable sur la biomasse résiduelle une fois l'extraction des lipides réalisée (Chisti, 2007).

## 1.2 Caractéristiques de biodiesel

Les propriétés physicochimiques de biodiesel présentant le plus grand intérêt sont le point éclair (Pe; flash point), le point de trouble (PT; cloud point), le point d'écoulement (PE; pour point), la viscosité cinématique, l'indice de cétane (IC), l'indice d'acide, la teneur en cendres sulfatées, les résidus de carbone, les teneurs en eau ainsi qu'en sédiments, le glycérol libre et le glycérol total, la température limite de filtrabilité, la corrosion à la lame de cuivre, la stabilité à l'oxydation et la masse volumique (Fernando et al., 2007; Knothe et al., 2005), (tableau 1.2).



**Tableau 1.2** : Propriétés physicochimiques du biodiesel de microalgues, du petro-diesel et de biodiesel

Propriété du carburant	Diesel	Références	Biodiesel	Références	Biodiesel issu de microalgues	Références
Pouvoir calorifique (MJ/Kg)	40 à 45	National Renewable Energy Laboratory (NREL) (2009)	40 à 42	Demirbas (2008) ; Srivastava et Prasad (2000)	41	Miao et Wu (2006)
Indice de cétane	40 à 55	Lapuerta et al. (2008)	45 à 70	Bozbas (2008); Srivastava et Prasad (2000)	39-54	Stansell et al. (2011)
Viscosité cinématique (mm <sup>2</sup> /s)	1.9 à 3.8	Bozbas (2008)	2.8 à 5.7	Demirbas (2008); Srivastava et Prasad (2000)	3.87-5.2	Johnson et Wen (2009); Miao et Wu (2006)
Densité (15.5°C)	0.81 à 0.89	Lapuerta et al. (2008)	0.86 à 0.89	Alptekin et Canakci (2008); Srivastava et Prasad (2000)	0.864	Miao et Wu (2006)
Soufre (%masse)	0.01 à 0.04	Bozbas (2008)	0.0000 à 0.0024	Bozba (2008)	0.0069	Johnson et Wen (2009); Miao et Wu (2006)
Point éclair (°C)	60 à 80	NREL (2009)	96 à 190	Srivastava et Prasad (2000)	115-204	Johnson et Wen (2009)
Point de trouble (°C)	-20 à 0	Lapuerta et al. (2008)	-3 à 15	NREL (2009); Srivastava et Prasad (2000)	Non rapportés	
Point d'écoulement (°C)	-35 à -15	NREL (2009)	-5. à 10	Tyson (2001)		
Stabilité à l'oxydation (h)			3 max	ASTM Standard 10 (2010)		
Lubricité (25°C)	0.509 à 0.238	Knothe (2005)	0.114	Knothe (2005)		

### 1.3 Les normes de Biodiesel

Les normes européenne (European Norm (EN) 14214) et américaine (American Society for Testing and Materials (ASTM) D6751-10) diffèrent sur certains niveaux pour le biodiesel. Par exemple : la norme EN 14214 stipule que, la teneur en esters polyinsaturés (> 4 liaisons) et la teneur en esters linoléiques doivent être inférieures à 1% (mol / mol) et à 12% (mol / mol) respectivement (Knothe, 2010).

Ces restrictions sont importantes pour la production de biodiesel via les microalgues puisque la composition d'esters est souvent riche en composés polyinsaturés et il est donc supérieure à ces niveaux (Johnson et Wen, 2009; Koberg et al., 2011). Certains autres paramètres de la norme EN 14214 ne sont pas présents dans la norme ASTM D6751-10 comme la teneur en esters, la densité, l'indice d'iode et la contamination de l'acide gras (tableau 1.3 ; 1.4 et 1.5).

**Tableau 1.3 :** Propriétés de biodiesel issu de microalgues selon la norme EN 14214 (Knothe, 2010)

Paramètres	Norme EN 14214
Indice de cétane	> (47-51)
Viscosité cinématique	< (5-6 mm <sup>2</sup> / s), 40°C
Stabilité oxydative	3-6 h

**Tableau 1.4 :** Propriétés de biodiesel issu de microalgues selon la norme ASTM (Johnson et Wen, 2009)

Paramètres	Norme ASTM
Indice d'acide	0,11 mg KOH/g, maximum 0,5 mg KOH/g
Glycérine libre	0,003% m/m, maximum 0,020% m/m
Glycérine totale	0,097% m/m, maximum 0,240 % m/m
Viscosité cinématique	1,9-6,0 mm <sup>2</sup> /s, 40°C
Point éclair	93 °C, maximum 204°C

**Tableau 1.5 :** Propriétés de biodiesel issu de microalgues selon la norme ASTM catégorie S15 (Miao et Wu, 2006)

Paramètres	Norme ASTM
Point éclair	115°C
Viscosité cinématique	5,2 mm <sup>2</sup> /s, 40°C
Indice d'acide	0,374 mg de KOH/g

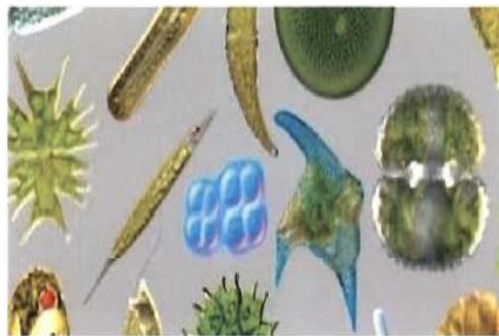
Malgré le fait que de nombreuses études aient été effectuées sur le biodiesel produit à partir de microalgues, peu d'entre elles s'assurent que celui-ci réponde aux normes officielles (Miao et Wu, 2006; Johnson et Wen, 2009). Cependant, en se basant sur notre connaissance actuelle de la littérature, la teneur en méthanol (EN 14110), les cendres sulfatées (D874), le point de trouble (D2500), la température de distillation (D1160), la stabilité oxydative (EN 15751) n'ont pas été mesurés pour le biodiesel issu de microalgues.

# **Chapitre 2**

## **Les microalgues**

## 2.1 Généralités sur les microalgues

Les microalgues sont des micro-organismes photosynthétiques eucaryotes (ex : algues vertes, rouges et brunes) ou procaryotes (ex : cyanobactéries) (figure 2.1). Elles peuvent être unicellulaires ou multicellulaires. Elles se développent rapidement dans différents biotopes et peuvent croître dans des conditions extrêmes : espèces halophiles dans les milieux très salés, espèces thermophiles dans les milieux très chauds,... Les microalgues sont présentes dans quasiment tous les écosystèmes terrestres et dans les milieux aquatiques. Il en existe une grande variété d'espèces estimées à 1 million dont 30 000 étudiées (Mata et al., 2010).



**Figure 2.1** : Quelques microalgues.

Les microalgues et cyanobactéries sont autotrophes ou bien hétérotrophes (carbone organique source de carbone et d'énergie). Cette distinction est capitale lorsque nous envisageons une valorisation de l'énergie piégée dans les microalgues : dans le cas de l'hétérotrophie, il faut avoir produit préalablement la source d'énergie.

Un des éléments marquants qui caractérise les microalgues est leur rendement photosynthétique très élevé. Ce rendement est le rapport entre l'énergie lumineuse incidente et l'énergie stockée dans la plante. Dans les conditions optimales, des études au laboratoire estiment qu'il faut 10 moles de photons pour fixer une mole de CO<sub>2</sub> (Benemann, 1997) (tableau 2.1).

**Tableau 2.1** : Taux de croissance de diverses espèces de microalgues et de cyanobactéries ainsi leur temps de doublement correspondant (résultats pour diverses conditions).

	Taux de croissance max (J <sup>-1</sup> )	Temps de doublement (J)
<i>Botryococcus braunii</i>	0,2	3,4
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3,8	0,18
<i>Chlorella vulgaris</i>	1,84	0,37
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	3,5	0,2
<i>Isochrysis galbana</i>	2,0	0,34
<i>Navicula muralis</i>	2,63	0,26
<i>Pleurochrysis carterae</i>	0,65	1,1
<i>Rhodomonas salina</i>	0,6	1,15
<i>Spirulina platensis</i>	0,5	1,38
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	2,48	0,27

## 2.2 Classification des algues

Les microalgues sont très rarement regroupées en fonction de leur métabolisme énergétique ou encore en fonction de leur habileté à synthétiser les métabolites nécessaires, mais plutôt en fonction de leurs propriétés morphologiques (figure. 2.2). Il existe différentes classes taxonomiques de microalgues dont les principales sont : les algues vertes, les algues bleues-vertes, les algues dorées, les algues rouges,...

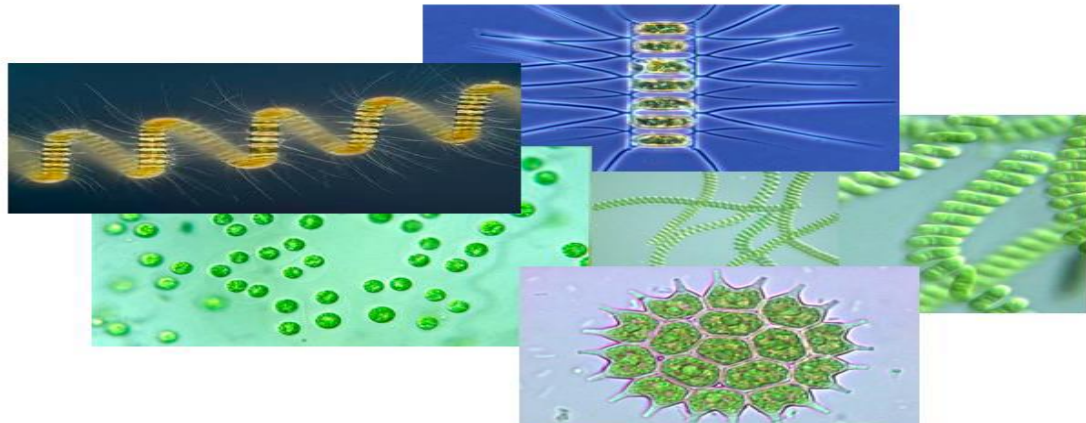


Figure 2.2 : Différentes formes de microalgues.

## 2.3 Reproduction des microalgues

Tous les organismes vivants passent par divers stades de vie, plus ou moins différents, avant de revenir à leur état initial. Ce processus est appelé cycle de vie, en raison de son caractère cyclique ou répétitif. La figure (2.3) montre le cycle de vie des microalgues qui comprend généralement des processus de reproduction sexuée et/ou asexuée (Claude, 2008 ; Abdennadher, 2014).

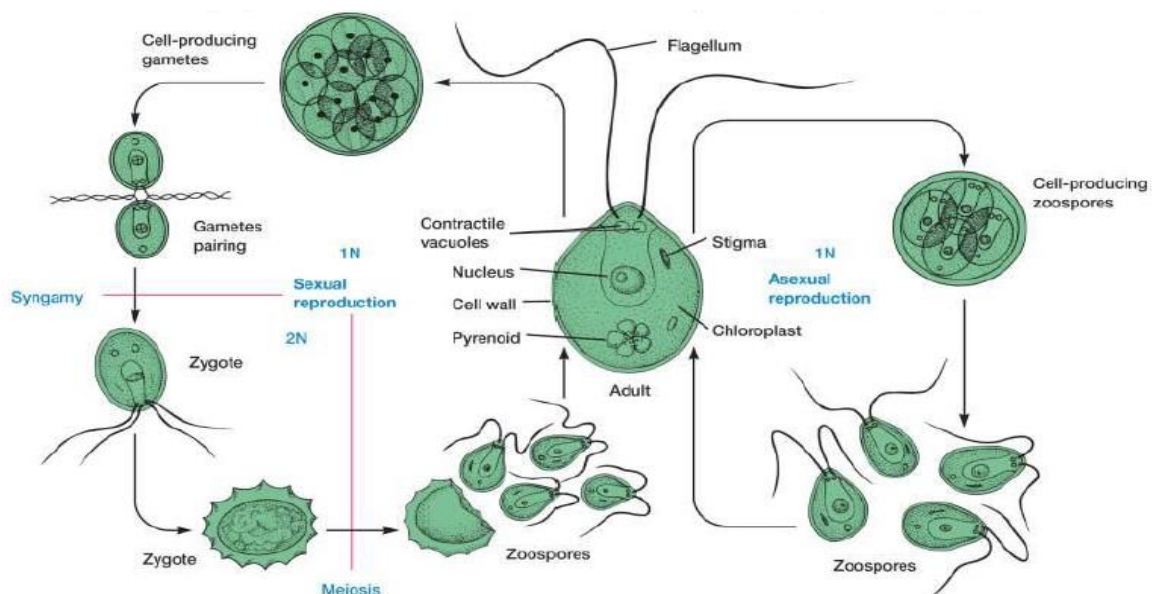


Figure 2.3 : Reproduction sexuée et asexuée chez Chlamydomonas.

## 2.4 Métabolisme algal

Les algues sont des organismes qui utilisent la lumière (photosynthèse) et du carbone inorganique (CO<sub>2</sub>) afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) et du sucre pour assurer leur croissance. Toutefois, les algues ont la capacité de changer de mode trophique en fonction des variations des conditions de l'environnement où elles se développent (Tableau 2.2). Elles peuvent passer d'un métabolisme à l'autre en fonction du milieu (Chojnacka-Katarzyna, 2004 ; Perez-Garcia et al., 2011).

En l'absence de lumière, les algues utilisent le carbone organique dans le but de substituer la fixation du dioxyde de carbone par la respiration cellulaire. Elles vont donc consommer de l'oxygène. Les microalgues utilisent le carbone organique et inorganique du milieu en présence de lumière pour subvenir à leurs besoins énergétiques. Elles vont donc utiliser simultanément la respiration cellulaire et la photosynthèse (Pittman et al., 2011 ; Perez-Garcia et al., 2011 ; Richmond, 2008).

**Tableau 2.2** : Modes trophiques utilisés par les microalgues.

Modes Trophiques	Nutriments	Molécules générées	Voies métaboliques
<b>Autotrophe</b>	H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> , sels minéraux	O <sub>2</sub> , composés organiques	Photosynthèse
<b>Hétérotrophe</b>	Matière organique et O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> , composés organique	Respiration
<b>Mixotrophe</b>	H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , sels minéraux et matière organique	O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> , composés organiques	Photosynthèse et Respiration

## 2.5 Composition biochimique des microalgues

L'intérêt des microalgues se manifeste par la diversité de leurs compositions biochimiques. Cette biomasse se différencie principalement des autres végétaux par sa richesse en lipides, protéines, polysaccharides, vitamines, pigments et antioxydants. Le tableau (2.3) recense la composition chimique de certaines espèces de microalgues.

Les microalgues représentent une source importante de quasiment toutes les vitamines essentielles : B1, B6, B12, C, E, K1 et possèdent un large panel de pigments, fluorescents ou non, pouvant aussi avoir un rôle d'antioxydants. En plus de la chlorophylle, pigment photosynthétique primaire chez toutes les algues photosynthétiques, on trouve toute une gamme de pigments supplémentaires de type caroténoïdes (0,1 à 0,2% de la matière sèche) et phycobiliprotéines (phycoérythrine et phycocyanine).

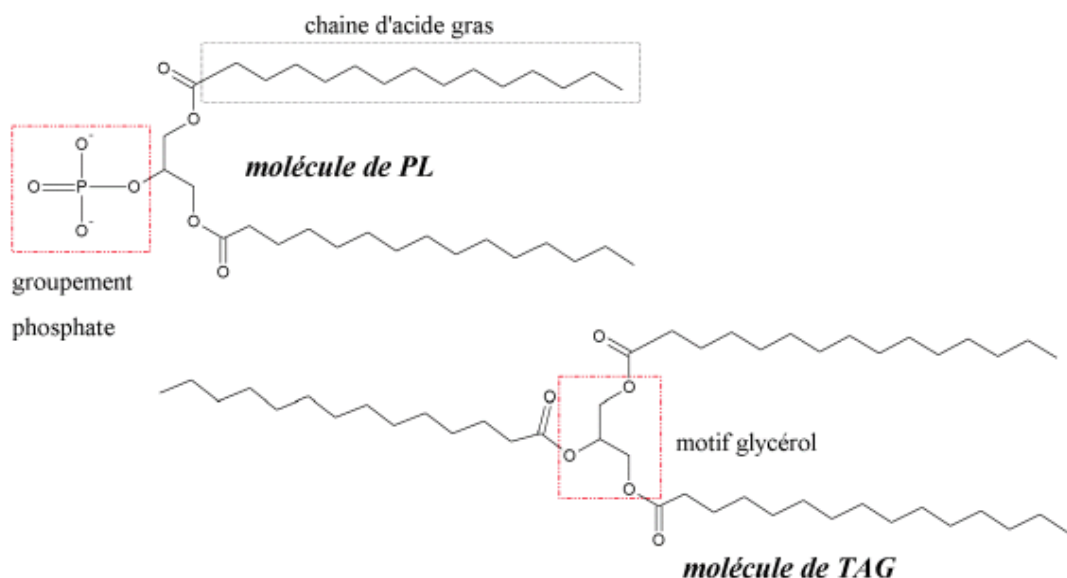
**Tableau 2.3** : Compositions biochimiques de microalgues (Becker, 2007).

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

Le contenu élevé en protéines, peptides et acides aminés (entre 12 et 65% de matière sèche) de plusieurs espèces de microalgues est une des principales raisons pour les considérer comme une source non conventionnelle de protéines dans l'alimentation humaine et animale (pisciculture).

Une cellule carencée en macronutriment comme l'azote va stocker le flux de carbone provenant de la photosynthèse sous forme de lipides. Ces derniers, en particulier les TAG (triacylglycérol) ouvrent une voie innovante de bio-production de diesel (Hu et *al.*, 2008).

La molécule de TAG est constituée d'un motif glycérol possédant trois fonctions hydroxyles sur lesquelles sont estérifiées trois chaînes d'acides gras et la molécule de phospholipide ou PL possède un groupement phosphate sur une des trois fonctions hydroxyles (figure2.4).



**Figure 2.4** : Structure chimique d'un triacylglycérol et d'un phospholipide

## 2.6 Teneurs en lipides des microalgues

La nature des lipides est une donnée importante pour la production de biodiesel. En effet, certaines microalgues peuvent contenir jusqu'à 93% (g lipide/g de matière sèche) de phospholipides et de glycolipides (Williams et Laurens, 2010). Par ailleurs, certaines microalgues peuvent aussi contenir d'autres types de lipides, comme les lipides insaponifiables, des caroténoïdes et autres éléments (chlorophylle) considérés comme des sous-produits (Bai *et al.*, 2011).

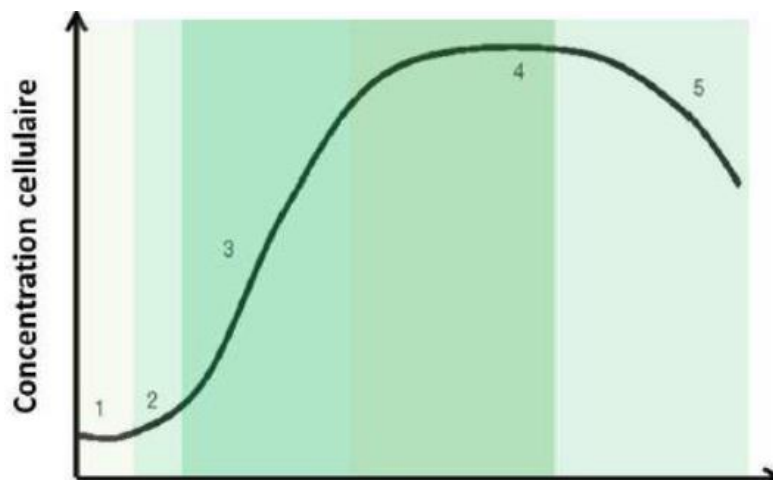
Ainsi, le rendement de la réaction de transestérification dépend de la nature des lipides. Ainsi, les monoglycérides ou MAG comme l'acide palmitique (C16 : 0) peut donner un rendement de 93% en FAME (g FAME / g de lipides) alors que les triglycérides comme la trioléine donnent un rendement de **88** % (g FAME / g de lipides). Par ailleurs, des rendements inférieurs de 54 à 65% (g FAME / g de lipides) et de 47 à 56% (g FAME / g de lipides) ont été obtenus respectivement à partir des phospholipides (PL) et des glycolipides (GL) (Nagle et Lemke, 1990).

## 2.7 Mode de culture des microalgues

Une culture d'algue peut être mise en place suivant deux modes, en batch (discontinu) et en continu. Ces modes de culture se différencient exclusivement par la régulation des apports en nutriments réalisée (Jauzein, 2009).

### 2.7.1 Culture en batch

En mode batch (discontinu), tous les éléments essentiels à la croissance de l'algue (lumière, azote, phosphore, carbone, microéléments) sont apportés au moment de l'inoculation (Larosiére, 2012). Ce dernier se fait en phase exponentielle (Melanie, 2009). La croissance connaît différentes phases caractéristiques présentent dans la (figure 2.5)



**Figure 2.5** : Courbe de croissance théorique de microalgues (Richmond, 2004).



**Phase de latence (1) :** au cours de cette phase qui dure de quelques heures à plusieurs dizaines d'heures, le taux de croissance est très faible (Chevanton, 2013).

**Phase d'accélération (2) :** les cellules commencent à se multiplier jusqu'à atteindre leur taux de croissance maximal, à ce stade les facteurs de croissance n'étant pas limitant (Chevanton, 2013).

**Phase de croissance exponentielle (3) :** la croissance est exponentielle et est maintenue constante jusqu'à ce que la composition du milieu ne soit plus optimale (Andersen, 2005).

**Phase stationnaire (4) :** un des éléments du milieu (lumière, azote, phosphore, carbone,...) devient limitant, et en conséquence la vitesse de croissance diminue, les quantités de cellules qui se divisent et qui meurent sont égales, ce qui produit un plateau de croissance. Les lipides et les glucides peuvent continuer à s'accumuler dans cette phase (Richmond, 2004).

**Phase de décroissance (5) :** la plupart des cellules ont épuisé leurs réserves intracellulaires de composants et elles n'ont plus suffisamment d'énergie à leur disposition pour poursuivre la maintenance cellulaire et meurent (Richmond, 2004).

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

### **2.7.2 Culture continu**

Le mode continu quant à lui correspond à un mode où la récolte se fait en continu sans arrêt (Melanie, 2009). Le principe repose sur l'application d'un flux entrant, contenant les éléments nutritifs, à un système de culture de volume constant contenant les microalgues. Par conséquent, le flux d'entrée impose au système un flux sortant de même débit correspondant à la production en biomasse algale (Melanie, 2009). Le but de la culture en continu est de maintenir la concentration cellulaire stable.

## **2.8 Mode hétérotrophe**

Le mode hétérotrophe est basé sur des organismes fonctionnant sans lumière en utilisant, pour se développer, l'énergie chimique et le carbone issus d'autres matières organiques. La production est effectuée en mode fermé dans des bioréacteurs semblables à des fermenteurs (figure 2.6). Les niveaux élevés de productivité enregistrés sont prometteurs pour la production de biocarburants (Xu et al., 2006). Cette approche, relativement coûteuse, dépend de nutriments agroalimentaires ; ce qui en limite l'application à la production de substances à hautes valeurs ajoutées comme certains suppléments alimentaires ou produits pharmaceutiques spécifiques (Xiong et al., 2008). L'exploitation des substances à valeur ajoutée pourrait éventuellement aider au financement de la production de biocarburants (CRBM : *Centre de Recherche en Biologie Cellulaire de Montpellier*, 2006).

A cet effet, plusieurs espèces de microalgues comme par exemple *Chlorella vulgaris* possède la capacité de se développer en hétérotrophie. Un mode de nutrition par lequel elle

assimile le COD (Carbone Organique Dissous). En l'absence de lumière, l'énergie requise pour la croissance est fournie par l'oxydation du substrat organique.

Toutefois, plusieurs facteurs sont à considérer lors de la mise en culture de microalgues en mode hétérotrophe pour la production de biomasse : coûts liés à l'utilisation du substrat, risques de contamination, inhibition de la croissance ...



**Figure 2.6 :** Fermenteur expérimental de 3 m<sup>3</sup> (Université Wagening, 2009).

Les avantages de ce mode de production sont : production et concentrations en matière sèche très importantes, coûts de production faibles, produits de très grande qualité, technologie totalement maîtrisée à l'échelle industrielle sur les levures et bactéries,...

Les cellules microalgales capables de croître en conditions hétérotrophes modifient leur profil d'expression génique en réponse à la disponibilité de différents substrats carbonés et à la disponibilité de la lumière. En effet, il a été démontré que des gènes codant pour plusieurs enzymes, impliquées entre autres dans le métabolisme du carbone, subissaient des changements de niveaux d'expression lors de l'ajout dans le milieu de culture d'une source de COD tels le glucose et/ou l'absence de lumière (Perez-Garcia et *al.*, 2011). Cette réponse est liée au changement de métabolisme de la photosynthèse vers la respiration cellulaire.

## **2.9 Conditions de culture des microalgues**

Une fois les microalgues retenues pour l'expérience, il faut étudier les différents facteurs qui peuvent affecter leur croissance et par conséquent leur productivité ou encore l'obtention de composés spécifiques (Alain, 2006). Pour obtenir une croissance optimale, il faut bien déterminer les paramètres en fonction des modes de culture (autotrophe, hétérotrophe etc.) qui sont : température, intensité lumineuse, pH, salinité, concentrations des/en nutriments, source de carbone inorganique ou organique et l'agitation.

## 2.10 Sources de carbone organiques : glucose et alternatives

Il a été prouvé plusieurs fois que le glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ) est une des sources de carbone organique aisément assimilable par les algues. Néanmoins le glucose présente un coût assez élevé ne permettant pas d'atteindre une production rentable en biocarburants.

L'utilisation de sources alternatives de carbone organique bon marché est donc une nécessité. Ces sources de carbone alternatives peuvent provenir des résidus d'industries laitières (exemple : lactosérum de fromagerie), des eaux usées et boues d'industries papetières, des boues de stations d'épuration municipales ou d'abattoirs porcins, d'hydrolysats de matières lignocellulosiques agricoles, des résidus brassicoles, des huiles et graisses usées d'usines, etc. Ces sources peuvent donc être de diverses origines.

## 2.11 Récolte des algues

La récolte des microalgues est, le plus souvent, une opération pas du tout aisée à réaliser à cause de leur faible taille. Cette étape peut s'avérer coûteuse et représenter une part économique importante dans le coût d'un procédé à échelle industrielle (Mata *et al.*, 2010). La récolte se fait via des procédés classiques tels que : la centrifugation, la filtration, la floculation, la sédimentation ou la flottation.

### ➤ La centrifugation

Cette technique de concentration utilise la force centripète afin de permettre la séparation des microalgues avec le milieu de culture par simple différence de densité. Selon Park *et al.* (2011), la centrifugation est efficace à 90% et le taux de récupération est directement lié au débit fixé en amont. Cependant, cette méthode est coûteuse en énergie ce qui la rend difficilement réalisable économiquement (Rawat *et al.*, 2011). De plus, l'exposition des cellules à cette force centripète peut également les endommager (Chen *et al.*, 2011).

### ➤ La sédimentation

La sédimentation est une technique qui repose sur le principe de gravité. Les cellules, soumises à la gravité, forment dans la partie inférieure un dépôt de particules solides et dans la partie supérieure une phase liquide. La vitesse de sédimentation est nettement améliorée grâce à l'ajout de flocculant (Chen *et al.*, 2011; Uduman *et al.*, 2010).

### ➤ La filtration

Il existe différentes formes de filtration ; la microfiltration, la filtration sous vide, sous pression, l'ultrafiltration et la filtration à flux tangentiel. Le choix du type de filtration dépend donc de la taille de l'espèce à récolter. En dépit d'être des méthodes de récoltes attractives, d'un point de vue énergétique, la microfiltration et la filtration sous vide sont coûteuses en

énergie. Le pompage de la biomasse demande une dépense énergétique élevée ainsi que le remplacement des membranes souvent victimes de colmatage.

➤ **La floculation**

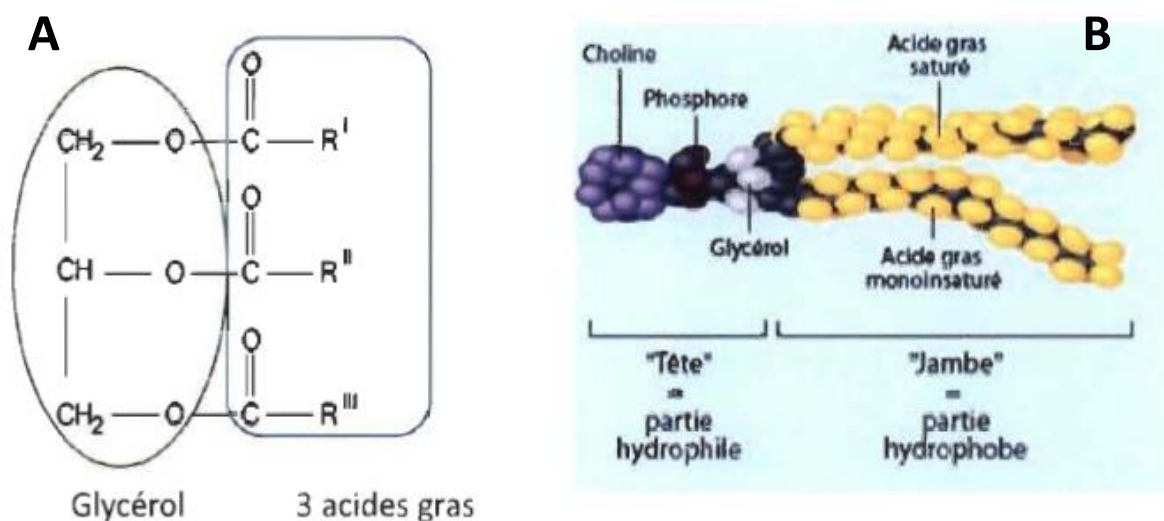
La floculation est un procédé dans lequel les particules en solution se rejoignent afin de former des agrégats, appelés floccs (Uduman *et al.*, 2010). Elle devient plus attractive lorsqu'elle est combinée à la sédimentation ou à la filtration (Rawat *et al.*, 2011).

## 2.12 Extraction des lipides chez les microalgues

Le but de cette étape est d'aller chercher les lipides et notamment les acides gras présents dans les cellules algales. L'extraction est réalisée en deux étapes selon le protocole utilisé par Zhu *et al.*, (2002) et les expérimentations de Bligh et ses collaborateurs (1959).

La première consiste à mettre en contact le solvant d'extraction avec la biomasse algale sèche et préalablement broyée en fine poudre. Le mélange, obtenu, est placé au bain marie à 65°C pendant 24 h. La seconde étape correspond à l'étape de filtration du mélange. Le filtrat est placé sous hotte afin d'évaporer le solvant d'extraction. Les lipides obtenus sont conservés au congélateur avant d'être transestérifiés.

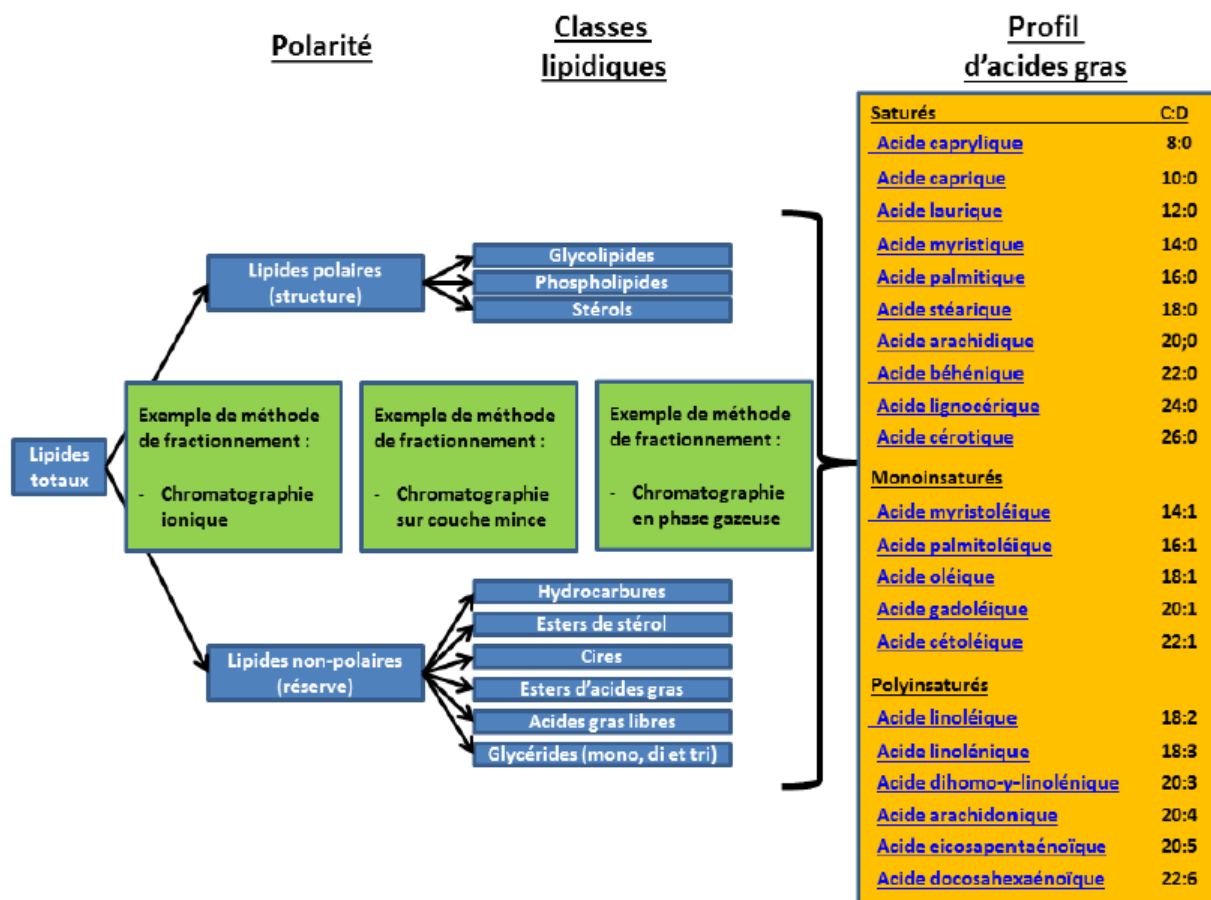
Les lipides présents dans les cellules algales sont généralement classés en deux grandes catégories, les **lipides neutres** (réserve) et les **lipides polaires** (structure). Les triglycérides, aussi appelés triacylglycérols (TAG), appartiennent à la première catégorie tandis que les phospholipides et glycolipides (figure 2.7) font partie du second groupe.



**Figure 2.7** : Un triglycéride (A) et un phospholipide (B) (Pruvost *et al.*, 2009).

Ce sont les triglycérides, qui sont des substances de réserve et s'accumulent dans les vacuoles des cellules, que nous ciblons. En effet, selon Pruvost et *al.*, les TAG ont un meilleur potentiel pour être transformés en biodiesel du fait de leur plus forte concentration en acide gras et de l'absence de groupement phosphate. Dans le cas des phospholipides la présence d'un groupement phosphate donne un diesel de moins bonne qualité, et il est plus difficile à purifier.

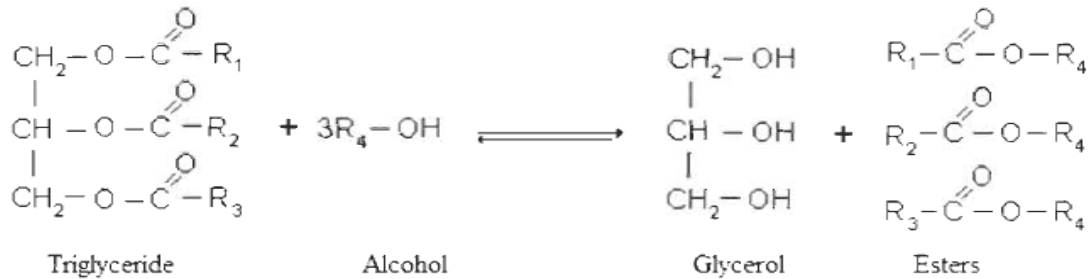
La figure (2.8) nous montre les différents paliers de détermination du profil lipidique d'un extrait lipidique total et exemples de méthodes analytiques de fractionnement tiré de Bastien et *al.* (2013), les CD (conjugated diene) ne reflètent le niveau de l'auto-oxxydation des lipides qu'à l'étape initiale du processus de peroxydation.



**Figure 2.8 :** Paliers de détermination du profil lipidique d'un extrait lipidique total

(Bastien et *al.*, 2013)

Les TAG sont transformés en biodiesel par une réaction de transestérification pour donner des esters d'alkyle d'acide gras. La réaction de transestérification ou encore appelée alcoolyse fait réagir un ester avec un alcool pour produire un ester différent comme le montre



la figure (2.9) (Vieitez et *al.*, 2012).

**Figure 2.9** : Réaction de transestérification d'un triglycérider (Vieitez et *al.*, 2012).

Selon Pruvost et *al.*, (2009), les TAG ont un meilleur potentiel pour être transformés en biodiesel du fait de leur plus forte concentration en acide gras et de l'absence de groupement phosphate. Dans le cas des phospholipides la présence d'un groupement phosphate donne un diesel de moins bonne qualité (Bastien et *al.* (2013).

Les TAG sont transformés en biodiesel par une réaction de transestérification pour donner des esters d'alkyle d'acide gras. Cette réaction, appelée alcoolyse, fait réagir un ester avec un alcool pour produire un ester différent comme le montre la figure (2.9) (Vieitez et *al.*, 2012).

### 2.13 Réaction de transestérification

La réaction de transestérification (figure 2.10) est une technique classique dans la production de biodiesel. Elle est réalisée selon la méthode de Li et *al.*, (2013).



**Figure 2.10** : Réaction de transestérification.

En règle générale, le groupement alkyle est un méthyle ou un éthyle car les réactifs les plus courants lors d'une transestérification sont le méthanol ou l'éthanol. Pour qu'une huile algale puisse donner du biodiesel, elle doit respecter plusieurs critères : la longueur des chaînes carbonées des acides gras, le nombre d'insaturations et leurs positions sur la chaîne. De plus, le ratio des acides gras a une répercussion directe sur la qualité du biocarburant

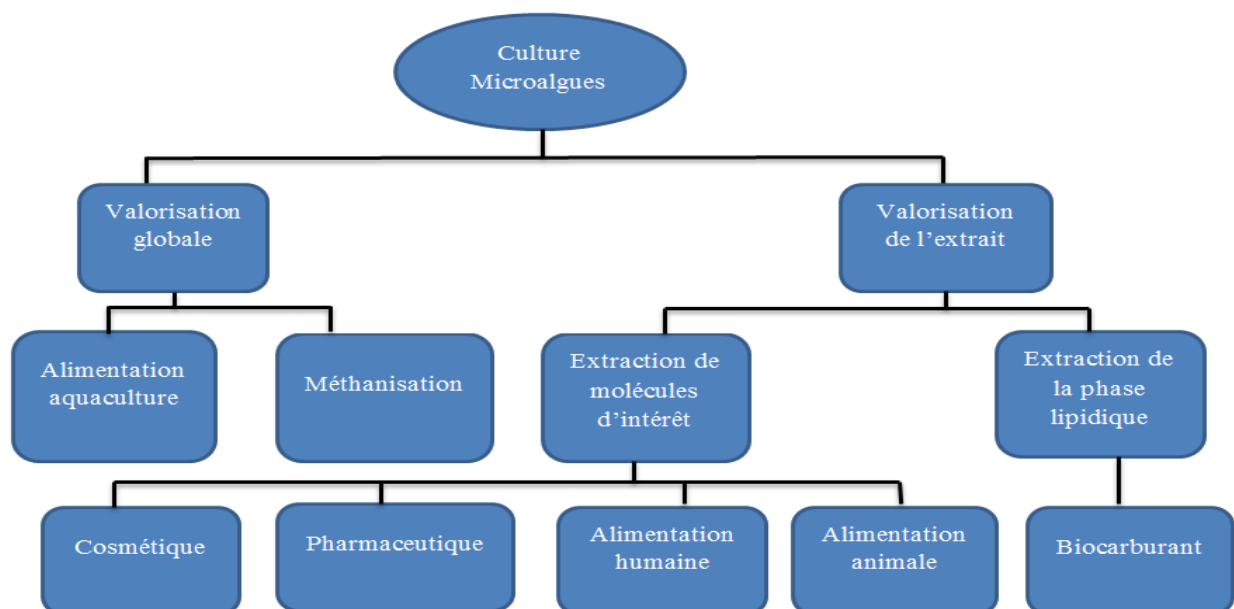
formé. Une huile algale contenant un taux important en acide gras mono-insaturés à 16 et 18 carbones est une huile au profil adéquat.

## 2.14 Autres voies d'applications

Les premières utilisations des microalgues datent de 2000 ans en Chine. Nostoc, une *Cyanobactérie*, avait été utilisée comme nourriture afin de survivre à la famine (Spolaore et al., 2006). De nos jours, la diversité des espèces et la richesse en métabolites permet un large panel d'applications impliquant ainsi de nombreux secteurs industriels (figure 2.11).

Les microalgues sont capables d'assimiler de nombreux nutriments nécessaires à leur croissance, elles peuvent donc éliminer certains éléments présents dans les eaux usées. Elles permettent ainsi de baisser les taux de phosphates et nitrates. Des travaux ont déjà été menés sur l'élimination des métaux lourds présents dans les eaux usées (Perales-Vela et al., 2006) et sur la dégradation de contaminants toxiques comme le tributylétain « TBT » par *Chlorella vulgaris* (Luan et al., 2006).

Un des principaux avantages de la culture des microalgues réside sur la capacité de la photosynthèse à absorber le CO<sub>2</sub>, qui est ensuite converti en biomasse, lipides, ou bioproduits précieux. Le CO<sub>2</sub> émis par les centrales thermiques, les industries de la sidérurgie, cimenterie, pétrochimie ou tout autre secteur peut donc être utilisé pour la culture industrielle des microalgues. Cela permet d'obtenir à la fois la réduction des émissions de gaz à effet de serre, la production de combustibles au bilan carbone neutre et des bioproduits valorisables.



**Figure 2.11** : Principales voies de valorisation des microalgues (Dejoye Tanzi, 2013).

### 2.14.1 Bioéthanol

Généralement, l'éthanol est produit à partir de matière première riche en sucre ou en amidon. Certaines microalgues disposent d'une paroi cellulaire composée de polysaccharides et d'autres peuvent contenir jusqu'à 50% d'amidon. Elles peuvent donc être utilisées comme matière première dans le processus de production d'éthanol. Des microalgues comme *Chlamydomonas perigranulata* ou *Chlorella vulgaris* peuvent aisément donner lieu à une production d'éthanol ou d'autres alcools grâce à l'auto-fermentation de leur amidon. La production et le stockage de l'amidon et de sucre dans une microalgue s'effectue au moment de la photosynthèse ou en la nourrissant directement de sucres.

### 2.14.2 Biohydrogène

Le biohydrogène est une source efficace d'énergie renouvelable qui suscite actuellement de nombreuses recherches. Les microalgues et les bactéries ont été étudiées, depuis plusieurs années, dans le but de produire de l'hydrogène. Hans Gaffron (1939) fut à l'origine de cette voie de production de l'hydrogène.



# **Chapitre 3**

## **Lactosérum**

### 3.1 Généralités

Le lactosérum, appelé autrefois petit lait, est un coproduit de l'industrie fromagère et de la préparation de caséinates (Jouan, 2002). Il fut découvert, il y a plus de 3000 ans avant Jésus-Christ, par des bédouins lors du transport de lait. L'acidification de la coagulation par la chaleur provoque la formation d'une phase liquide au-dessus d'un caillé de lait (De Witt, 2001) (figure. 3.1). Le lactosérum est très fermentescible et fragile. Il représente 90 % du volume original de lait utilisé en fromagerie et en est le principal sous-produit (Molleta, 2002). Il contient environ 50 % des nutriments du lait de départ : protéines solubles, lactose, vitamines et minéraux (Tetra Pack Processing system, 1995).

Le terme *lactosérum* se rapporte au liquide translucide et jaune verdâtre qui se sépare du caillé (Heslot, 1996), après séparation des caséines par coagulation acide ou par processus enzymatique au moyen de la présure ou de la chymosine (Jouan, 2002).

Il existe deux types de lactosérums obtenus à partir de deux procédés de coagulation. Le lactosérum doux et le lactosérum acide (tableau 3.1).



**Figure 3.1** : Coagulation du lait

**Tableau 3.1** : Différents types de lactosérum (Adrian et *al.*,1991)

Degré d'acidité	Type	pH	Production
<18° D	Lactosérum doux	6,5 ± 6,7	- Fromagerie à pâte pressée -Fromagerie à pâte cuite -Caséinerie présure
>18° D	Lactosérum acide	4,5 – 5,5	- Fromagerie à pâte fraîche - Fromagerie à pâte molle - Caséinerie acide

La composition des lactosérums (tableau. 3.2) et ses caractéristiques sensorielles sont variables et dépendent de type de lactosérum (acide ou doux), de l'origine du lait (vache, chèvre, brebis), de l'alimentation de l'animal qui produit le lait, du traitement utilisé, de la période de l'année et du stade de lactation.

**Tableau 3.2** : Composition générale de lactosérum doux et acide (Sottiez, 1990)

	Lactosérum doux	Lactosérum acide
<b>Liquide %</b>	93,5	94
<b>Extrait sec %</b>	6,5	6,00
<b>pH</b>	6,70	4,60
	<b>Composition en g/L</b>	
<b>Lactose</b>	76,00	74,00
<b>Protéines</b>	13,50	12,00
<b>Cendres</b>	8,00	12,00
<b>Acide lactique</b>	1,80	1,80
<b>Matière grasse</b>	1,00	0,50
	<b>Matière minérale</b>	
<b>Ca %</b>	0,60	1,80
<b>P %</b>	0,60	1,50

### 3.2 Valeur nutritionnelle

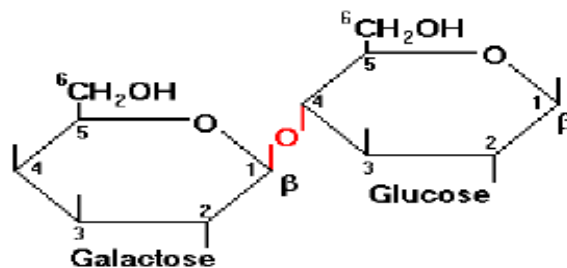
La valeur nutritionnelle et les propriétés fonctionnelles du lactosérum sont liées au lactose et aux protéines (Lupin, 1998).

#### 3.2.1 Lactose

Le lactose est un disaccharide, composé d'une molécule de glucose et une autre de galactose. Ce dernier est un constituant essentiel des cérébrosides composant les tissus nerveux (figure. 3.2), (Gerard et Debry, 2001).

D'après Sottiez (1985) le lactose du lactosérum a de nombreux intérêts fonctionnels très intéressants :

- contribue à stabiliser le pH intestinal d'où une meilleur utilisation digestive du calcium et du phosphore. Cette stabilité du pH évite l'installation de flores purifiantes,
- représente un intérêt diététique fondamental puisqu'il est la seule source d'hydrate de carbone de tous les mammifères y compris l'homme,
- facteur favorable aux réactions de caramélisation et réaction de Maillard,
- très bon support d'arôme et bon substrat de culture pour les ferments de maturation.



**Figure 3.2** : Structure moléculaire du lactose (Gerard et Debry, 2001).

#### 3.2.2 Protéines

Les protéines du lactosérum ont une meilleure valeur nutritive que la caséine, du fait qu'elles constituent une source équilibrée en acides aminés indispensables notamment en lysine, acide aminés soufrés et en tryptophane tandis que la caséine présente un léger déficit en ces acides aminés (Linden et Lorient, 1994).

D'après Sottiez (1985), les protéines du lactosérum ont des propriétés fonctionnelles très intéressantes :

- Pouvoir émulsifiant en présence de matière grasse
- Pouvoir gélifiant par coagulation à la chaleur
- Pouvoir moussant

### 3.3 Quantités produites et charge polluante

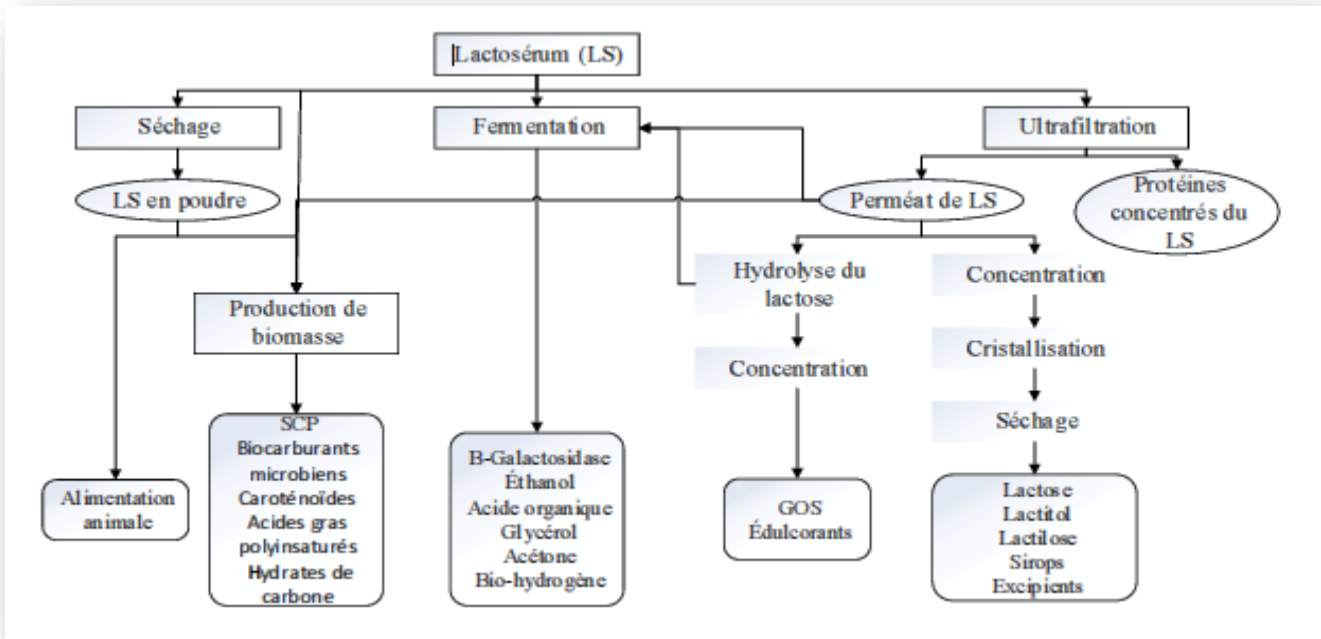
Selon l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, *Food and Agriculture Organization* (FAO) (2011), la production mondiale de fromage a été estimée à 9670 kt en 2010. Ce qui a engendré environ 177 028 kt de lactosérum en tant que sous-produit. Le taux de croissance annuel est estimé à 1,64 %, soit environ 211500 kt de lactosérum en 2020. En moyenne, 9 L de lactosérum sont obtenus lors de la production d'un kilogramme de fromage (Iker et *al.*, 2006, Kosikowski, 1979 ; Panesar et Kennedy, 2012). Pour chaque 100 kg de lait utilisé pour fabriquer du yaourt grec, seulement 33 kg sont utilisés dans le produit final. Les deux tiers restants constituent le lactosérum acide (Site web [3]). En Algérie, la production du fromage a augmenté de 110 t (1962) à 1540 t (2013). D'où une production annuelle de lactosérum qui dépasse les 13860 de tonnes (Site web [1]).

Le rejet du lactosérum dans l'environnement constitue une source de pollution à cause de sa demande biochimique en oxygène qui est très élevée entre 3,2 à 60 g d'O<sub>2</sub> /L, (Cheryan, 1998). Ainsi, le lactosérum engendre une pollution organique importante soit : 1 L correspond à environ 85% de la pollution journalière générée par un habitant (Laplanche et *al.*, 2006). Plusieurs opérations membranaires sont proposées pour le traitement des effluents des laiteries telles que les opérations à un seul étage comme l'ultrafiltration (UF) (Blanchard, 1991) et la nano filtration (Koyuncu et *al.*, 2000).

Le coût de traitement du lactosérum en station d'épuration élève le prix de revient des spécialités fromagères issues du lait. L'épandage est également une destination envisagée mais les volumes annuels produits (on parle de 100 millions dans le monde) satureront vite cette solution. Enfin si on se réfère à la composition du lactosérum, on y retrouve des composés d'intérêt ; d'où la possibilité de valorisation.

### 3.4 Valorisation du lactosérum

Environ 50% de la production mondiale du lactosérum est traitée et transformée en divers produits alimentaires, dont environ 45% sont utilisés directement sous forme liquide, 30% sous forme de poudre, 15% en tant que lactose et ses dérivés, et le reste pour la fabrication des concentrés de protéines du lactosérum (Marwaha et Kennedy, 1988). En effet, trois options différentes d'utilisation de lactosérum peuvent être envisagées (figure 3.3).



**Figure 3.3** : Différents procédés de valorisation de lactosérum (Siso, 1996 ; Panesar et Kennedy, 2012 ; Da-Silva *et al.*, 2014)

La valorisation du lactosérum en alimentation humaine et en industrie chimique est pharmaceutique est rendu possible grâce aux craquage pour obtenir, par fractionnement, des composées protéiques et glucidique (Moletta, 2002 ; Christansen *et al.*, 2004).

### 3.4.1 Alimentation humaine

Les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des protéines du lactosérum ont rendu son utilisation possible dans de nombreux domaines de l’industrie agroalimentaire en particulier en tant que texturant, foisonnant ou ingrédient nutritionnel (Damodaran, 1997 ; Molletta, 2002) (tableau 3.3).

**Tableau 3.3** : Application des protéines du lactosérum (Linden *et al.*, 1994)

Produits	Fonctions
Produits de boulangerie-biscuiterie	Apport protéique, rétention d’eau, gélifiant, texture
Pâtes alimentaires	Apport protéique, texture
Boissons lactées ou fruitées	Soluble à chaud ou / et pH acide, Epaississant
Confiserie (caramel, nougats ...) Chocolat au lait	Emulsifiant, arôme, texture, dispersibilité

### 3.4.2 Alimentation animale

Les poudres du lactosérum sont utilisées dans les aliments d'allaitement pour veaux. Elles sont également employées, de même que les concentrés liquides, en mélange avec d'autres aliments (hachis de paille, farine,..) pour animaux d'élevage (bovins, porcins, volailles) (Zadow, 1989).

#### ❖ Pour le bétail laitier

La consommation du lactosérum liquide par les vaches, en période de lactation diminue la consommation de foin et de céréales mais n'affecte pas la production laitière. Une économie de 15% sur les coûts de gain de poids avec les régimes riches en lactosérum pour les vaches en période de lactation.

#### ❖ Pour le veau

L'ultra filtrat du lactosérum à l'état liquide et bien toléré par le veau après sevrage. Il peut remplacer la totalité de l'eau de boisson, et apporter jusqu'à 30-35% de la matière ingérée chez les animaux pesant 100 à 110 kg. En outre le lactosérum peut être utilisé pour d'autres animaux : volailles et ovins (Luquet et Boudier, 1984).

### 3.4.3 Domaine biotechnologique

#### ❖ Biotransformation de lactose

Elle permet la production des solvants, des vitamines, des polysaccharides du méthane, des enzymes, des acides aminés et organiques et de nombreux autres composés à partir de lactose du lactosérum (Zadow, 1989).

#### ❖ Substrat de fermentation

Le lactosérum par sa composition biochimique possède d'intéressantes propriétés comme milieu de fermentation pour plusieurs microorganismes assimilant le lactose comme source de carbone et d'énergie (Alais, 1975) :

- **Les bactéries** : à titre d'exemple *Lactobacillus casei* pour la production d'acide lactique (Morabito, 1994).
- **Les moisissures** : à titre d'exemple *Penicillium camemberti* producteur de protéases (Mechakra et al., 1999).

# **Partie 2**

## **Partie expérimentale**



# **Chapitre 4**

## **Matériels et méthodes**

Les expériences ont été effectuées au niveau du laboratoire de Biotechnologie des microalgues à l'Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables UAREAR (Ghardaïa, Algérie). Elles ont porté sur la culture de chlorelle, localement isolée, pour la production de biodiesel.

#### **4.1 Prélèvement et méthode d'échantillonnage**

##### **4.1.1 Le prélèvement de microalgues**

Le prélèvement de microalgues a été réalisé au niveau d'un bassin qui appartient aux travaux d'un puits de forage d'eau situé à *Metlili* dans la wilaya de Ghardaïa à une profondeur de 10 cm. L'opération a été effectuée au mois de février 2019 par temps d'ensoleillement 14° C.

##### **4.1.2 Analyse physicochimique de l'eau collectée**

La nature et la composition de l'eau conditionnent le développement et la répartition des microalgues. Les analyses physicochimiques ont été effectuées à l'aide d'un multiparamètre de type « HANNA HI 9829 », équipé de sondes « HI 7609829 » : pH, thermomètre, oxymètre et conductimètre.

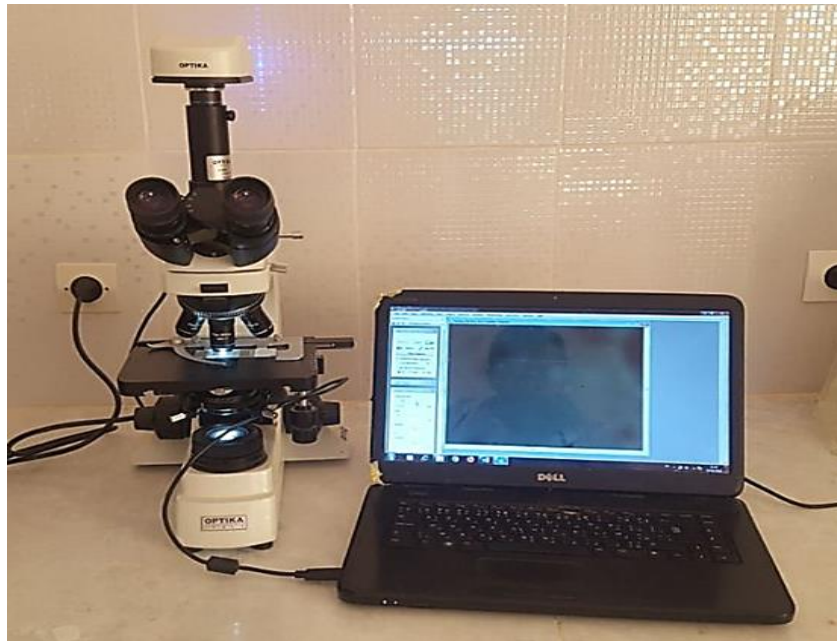
##### **4.1.3 Identification et caractérisation des espèces microalgales dans les échantillons prélevés**

L'identification est réalisée à l'aide d'un microscope optique (x40 et x 100) de type « Optica WF10X/22 » sur lequel est intégrée une caméra digitale « M-699 ». La lecture directe sur ordinateur est rendu possible avec le logiciel « Optica Vision Pro » (figure 4.1). En outre, une identification plus poussée a permis de mettre en évidence la présence de différentes espèces algales dans les échantillons prélevés. Pour ce faire, une goutte d'eau est mise sur une lame de verre puis recouverte avec une lamelle transparente. Le dispositif est alors passé au microscope optique pour observation (x40 et x100).

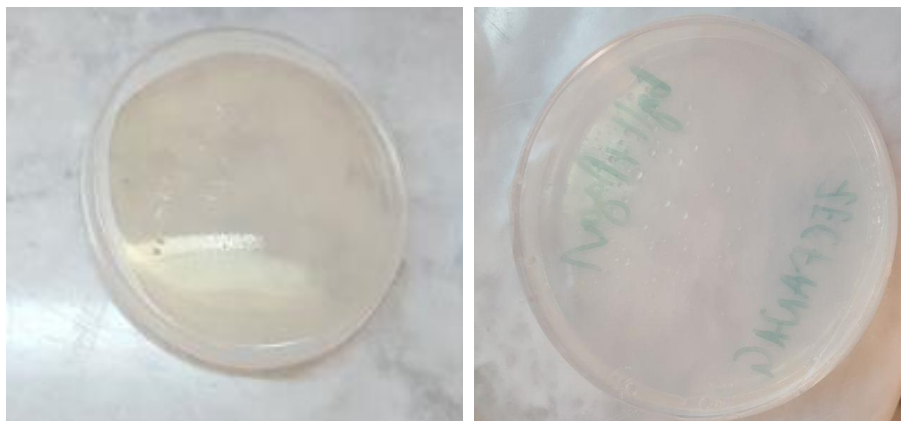
#### **4.2 Identification, Isolement et purification des souches de la *Chlorella vulgaris***

L'identification des souches isolées est basée sur l'observation des caractéristiques morphologiques de la colonie à l'œil nu et cytomorphologiques sous microscope, caractéristiques morphologiques qui sont la taille, la forme etc. et par l'utilisation de livre d'identification de références comme celui de Gayral (1975) et de De Reviers (2002).

Une première identification est faite directement après prélèvement, puis renouvelée après les ensemencements et repiquages répétés, ces derniers ont été effectués sur un milieu d'isolement dans des boîtes de pétri (figure 4.2). Les colonies correspondantes aux chlorelles ont été prélevées et étalées sur de nouvelles boîtes de pétri. Cette opération a été répétée plusieurs fois pour s'assurer de l'isolement d'une colonie correspondant à la souche de *Chlorella*. La souche isolée a été attribué, en plus du nom de l'espèce, un code d'identification rappelant la zone de prélèvement.



**Figure 4.1 :** Microscope



**Figure 4.2 :** Isolement des microalgues dans des boîtes de Pétri

L'isolation et la purification de la souche *Chlorella vulgaris* ont été réalisées pendant une durée de 1 mois suivant le protocole mis au point par Ghobrini et *al.* (2017). A noté que d'ordinaire la période d'isolation peut aller jusqu'à 6 mois.

#### **4.3 Milieu de culture utilisé pour l'isolation de la souche de chlorelle**

L'isolement des différentes espèces microalgales a été réalisé dans le milieu de culture BG11 modifié par Ghobrini non publié. Il est important de signaler que la modification du milieu permet d'une part de favoriser l'apparition de colonies de Chlorelles de couleur jaune mais aussi de réduire les temps de leur apparition à 7 jours. Cette modification permet, aussi, le développement rapide de souches isolées (2 jours maximum) dans le cas des repiquages en stries.

Ce milieu est simple et convient à toutes les souches de microalgues, principalement, vertes et aux cyanobactéries. En supposant l'existence, même en faible concentration, d'espèces particulières, ce milieu est utilisé pour favoriser la prolifération du plus grand nombre d'espèces possible.

#### **4.3.1 Composition chimique du milieu BG11**

La composition chimique en sels des solutions mères microéléments I et II utilisées pour préparer le milieu BG11 est donnée dans le tableau 4.3.

**Tableau 4.1** : Composition des solutions mères microéléments I et II

<b>Solutions concentrées de microéléments</b>		<b>g/L</b>
Microélément 1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	18.5
	CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	21
	MnCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	73.2
	CoSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	13.7
	ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	59.5
Microélément 2	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	3.8
	(NH <sub>4</sub> )VO <sub>3</sub>	0.31

La composition chimique du milieu est représentée dans le tableau 4.2. Avant de préparer le milieu et pour une meilleure utilisation des sels, il est conseillé de préparer un ensemble de solutions mères concentrées (tableau 4.3).

**Tableau 4.2** : Composition globale du milieu de culture

<b>Composants</b>	<b>Concentrations du milieu (mg/L)</b>
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	1100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	238
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	204
C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub> NaFe, EDTA	40
CaCl <sub>2</sub>	88
Microélément 1	-
Microélément 2	-

#### **4.3.2 Préparation des solutions mères**

Les solutions ont été préparées à une température ambiante dans des Erlenmeyers de 1 L. Ces dernières ont été mises sous agitation « agitateur Stuart SB 162 » puis conservées dans des flacons de 1 L dans le réfrigérateur.

**Tableau 4.3 :** Composition des solutions mères utilisées pour préparer le milieu final

Solution mère	Solution mère (g/L)	mL de solution mère/L milieu
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	110	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	23,8	10
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	204	1
C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub> NaFe	40	1
CaCl <sub>2</sub>	88	1
Microélément 1	-	2
Microélément 2	-	2

### 4.3.3 Préparation de milieu de culture gélosé pour des boîtes de Pétri

Le milieu utilisé pour isoler la souche de *Chlorella* est un milieu solidifié par de l'agar à 15%. Le pH est ajusté à 7 avant autoclavage avec du NaOH 1N. En outre, du NaNO<sub>3</sub> est mis dans le milieu à la place de l'urée car l'urée est thermolabile (instable à des températures élevées). Le milieu préparé est stérilisé dans l'autoclave de marque « SANO clav » à 120°C pendant 20 min avant d'être versé dans des boîtes de Pétri pour refroidissement (figure 4.3).



**Figure 4.3 :** Stérilisation du milieu de culture

### 4.3.4 L'inoculation

Un volume de 3 à 5 mL de la solution d'eau échantillonnée est versé dans les boîtes de Pétri contenant, déjà, le milieu de culture BG11 gélosé. Les boîtes sont hermétiquement fermées avec du para-film et maintenues à la température ambiante sous une lumière artificielle 24h/24h (figure 4.4). Les colonies formées sont transférées sur de nouvelles boîtes de pétri (repiquages).



**Figure 4.4 :** Isolation des souches de Chlorelle en culture dans des boîtes de Pétri

#### **4.4 Culture de la souche localement isolée en mode hétérotrophe**

##### **4.4.1 Conditions de travail**

Ces expériences doivent s'effectuer dans une zone stérile à proximité d'une flamme produite par un brûleur à gaz. Elle crée autour d'elle une sphère stérile grâce à la chaleur qu'elle dégage (20 cm de diamètre). Il est alors possible de travailler en conditions stériles dans cette sphère.

##### **4.4.2 Etude du comportement de la souche *C. vulgaris***

Le test de préculture et de culture a été réalisé pour vérifier le comportement de la souche de *C. vulgaris* localement isolée dans les deux milieux BG11 et lactosérum. Afin de vérifier son développement : cinétique de croissance, taux de glucose, etc.

##### **4.4.3 Préparation de la culture mère (préculture)**

Pour le lancement des paramètres de l'étude et afin de faire l'inoculation à partir des échantillons contenus des boîtes de Pétri, une préculture, phase d'adaptation, de la souche est entreprise comme suit : une quantité de  $10^8$  cellules/mL de milieu est prélevée, à l'aide d'une lance d'inoculation, des cultures de la souche de *C. vulgaris* localement isolée. Elle est inoculée dans 150 mL du milieu BG11, additionné de 10 g/L de glucose, dans deux erlenmeyers (300 mL) hermétiquement scellés avec des bouchons en papier. Le pH est ajusté à 7 avant autoclavage (120 °C, 20 min).

Les cultures sont, alors, incubées avec agitation (150 tr/min) et maintenues à l'obscurité à une température de  $30 \pm 2$  °C (figure 4.5).



**Figure 4.5 :** Agitateur orbitale

#### **4.5 Préparation du lactosérum**

Le lactosérum, de pH = 5,2 a été collecté au niveau de la laiterie de Ghardaïa. Il a été conservé dans un réfrigérateur à 4°C.

L'hydrolyse chimique a été effectuée par l'addition de l'acide sulfurique 1N jusqu'à pH = 4.6 avec chauffage pendant 10 min à 80 °C. Une fois refroidi, le pH du milieu est ajusté une deuxième fois par l'addition de NaOH (1N) à la valeur de 6.8 pendant 10 min à 80 °C.

#### **4.6 Détermination de taux de glucose**

La concentration de glucose dans la culture a été obtenue à l'aide d'un réfractomètre électronique model « ATAGO PAL-79S » (figure 4.6) après étalonnage de l'appareil.



**Figure 4.6:** Réfractomètre

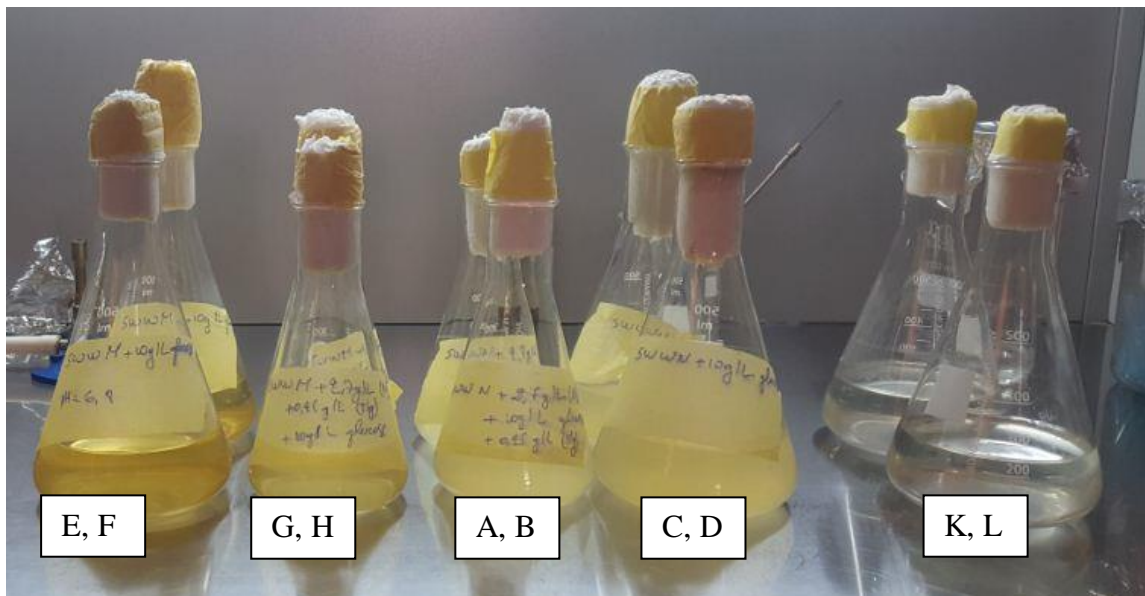
#### 4.7 Culture de la souche *Chlorella vulgaris* localement isolée

La souche *Chlorella vulgaris* a été cultivée, à pH 7, dans trois milieux : BG11 (composition tableau 4.2), lactosérum hydrolysé et lactosérum non hydrolysé, initialement supplémentés de 10 g/L de glucose.

Les cultures ont été réalisées dans des erlenmeyers scellés par des bouchons en papier à une température 120°C pendant 20 min. Une fois les milieux inoculés, les erlenmeyers sont soumis à une agitation à 150 tr/min pendant 5 j en absence de lumière à  $(30 \pm 1)$  °C, tableau 4.4 et figure 4.7.

**Tableau 4.4 :** Milieux de culture utilisés pour l'étude de la cinétique de croissance de *C. vulgaris*

Erlenmeyers	Milieu	Supplément
A et B de 300 mL pour un volume de 150 mL	Lactosérum non hydrolysé	NaNO <sub>3</sub> 2.7g/L, MgSO <sub>4</sub> 0.25 g/L 10g/L glucose
C et D de 500 mL pour un volume de 250 mL	Lactosérum non hydrolysé	10g/L glucose
E et F de 500 mL pour un volume de 250 mL	Lactosérum hydrolysé	10g/L glucose
G et H de 300 mL pour un volume de 150 mL	Lactosérum hydrolysé	NaNO <sub>3</sub> 2.7g/L, MgSO <sub>4</sub> 0.25 g/L 10g/L glucose
K et L de 500 mL pour un volume de 250 mL	BG11	10g/L glucose



**Figure 4.7 :** Milieux de culture utilisés



#### 4.7.1 Cinétique de croissance de la souche *C. vulgaris* par la méthode gravimétrique

Des prélèvements réguliers sont effectués sur les cultures afin de déterminer la courbe de croissance de la souche isolée au niveau des différents milieux utilisés. A cet effet, 2 mL de milieu sont prélevés, à l'aide de pipettes stériles, et placés dans des Eppendorf pesés au préalable. Après centrifugation pendant 5 min à 60000 tr/min, le surnageant est jeté alors que le culot est lavé avec de l'eau distillée puis passé dans un agitateur vortex. Cette dernière opération est répétée trois fois pour chaque prélèvement.

Après 24h de séchage les Eppendorf ont été pesés et la biomasse a été déterminée suivant la formule ci-dessous :

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

#### 4.7.2 Mesure du pH et du taux de glucose

Le suivi du pH et du taux de glucose pour les cultures réalisées a été effectué en parallèle avec la cinétique de croissance. Le suivi du pH permet de détecter une anomalie au niveau des cultures par exemple la contamination dans le milieu si le pH change brusquement. Par ailleurs, le taux de glucose a été déterminé à l'aide de la gamme étalon précédemment réalisée.

### 4.8 Récolte, Extraction et Transestérification

#### 4.8.1 Récolte

Une fois les cultures effectuées, la biomasse algale a été récoltée. Le but de cette étape est de récupérer le maximum de biomasse afin de réaliser par la suite une extraction des lipides pour les quantifier et les analyser.

La récolte a été effectuée pour toutes les expériences par centrifugation (15 min, 6000 tr/min). Au total, Deux centrifugations ont été réalisées. La première centrifugation permet de séparer la biomasse de son milieu de culture. La deuxième centrifugation permet le nettoyage (éliminer au maximum les traces du milieu de culture) de la biomasse par l'ajout d'eau distillée.

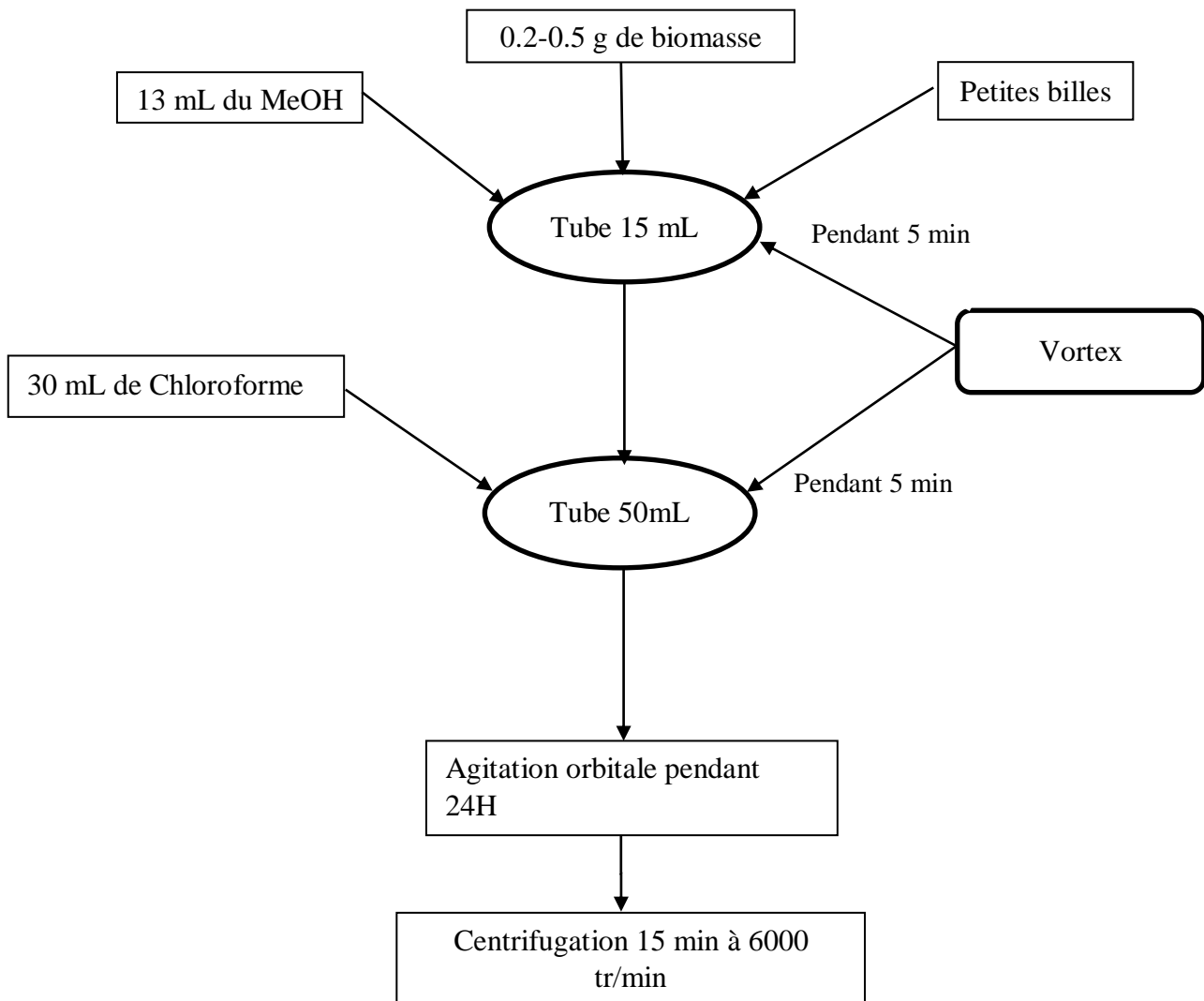
Après l'étape de centrifugation, la biomasse algale humide a été récupérée dans des béchers de 100 mL puis soumise au séchage suivant deux méthodes, la première par l'utilisation d'une étuve à 40°C et la deuxième par l'utilisation d'un séchoir solaire indirect avec chicanes (Benseddik non publié) (figure 4.8).

Cette étape permet d'obtenir une biomasse algale sèche par évaporation du surplus d'eau présent au niveau de la biomasse récoltée à la fin de la culture.



**Figure 4.8 :** Séchoir solaire indirect avec chicanes (BENSEDDIK non publié)

#### 4.8.2 Extraction



**Figure 4.9 :** Protocole d'extraction des lipides à partir des microalgues selon Bligh et Dyer (1959) légèrement modifié par Ghobrini et *al.* (2017)

Les tubes de 15 mL ont été lavés deux fois avec 5 mL de méthanol pour récupérer toute la biomasse dans les tubes de 50 mL. Le surnageant a été récupéré à l'aide d'une micropipette dans des béchers de 100 mL préalablement séché et pesé. La phase organique est évaporée dans l'étuve à 45°C sous une ventilation figure 4.10.

La pesée du bécher au préalable après passage dans l'étuve puis le calcul du poids du même bécher contenant l'extrait lipidique après évaporation du solvant permet de calculer la teneur en lipides exprimée en (g) selon l'équation suivante :

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

La teneur en lipides :

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

Avec : m : biomasse (g) ; mh : masse d'huile (g)



**Figure 4.10** : Evaporation de la phase organique

### 4.8.3 Transestérification

Pour hydrolyser les liaisons esters, libérer les acides gras et former des esters méthyles des acides gras, un mélange du méthanol acidifié par environ 1 % d'acide sulfurique a été utilisé. En fin de réaction, la solution est transférée dans une ampoule à décanter contenant 20mL d'hexane. Après agitation et séparation du glycérol et de biodiesel, ce dernier est transféré dans une ampoule à décanter et lavé avec 20mL d'eau déminéralisée afin de neutraliser l'acide et d'éliminer le méthanol en excès. La séparation des phases organique (biodiesel) et aqueuse se fait à température ambiante pendant une nuit. Le biodiesel produit est ensuite récupéré, séché avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et le méthanol est évaporé sous pression réduite à 60 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif.

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

$$R (\%) = (mb/mh) \times 100$$

Avec : mb : masse de biodiesel (g) ; mh : masse d'huile (g).

Pour obtenir des données sur la nature de biodiesel et certains cas pour l'identifier, une étude de ses propriétés physicochimiques a été effectuée qui s'attache surtout à la détermination de la densité, l'indice de réfraction à l'aide d'un réfractomètre d'ABBE, pH, etc.

# **Chapitre 5**

## **Résultats et discussion**

### 5.1 Répartitions et isolement des souches de microalgues

La répartition qualitative et quantitative des microalgues est fonction de la nature des eaux où elles prolifèrent. Notre échantillon provient de la ville de *Metlili* située dans la wilaya de Ghardaïa.

### 5.2 Analyse physicochimique des eaux

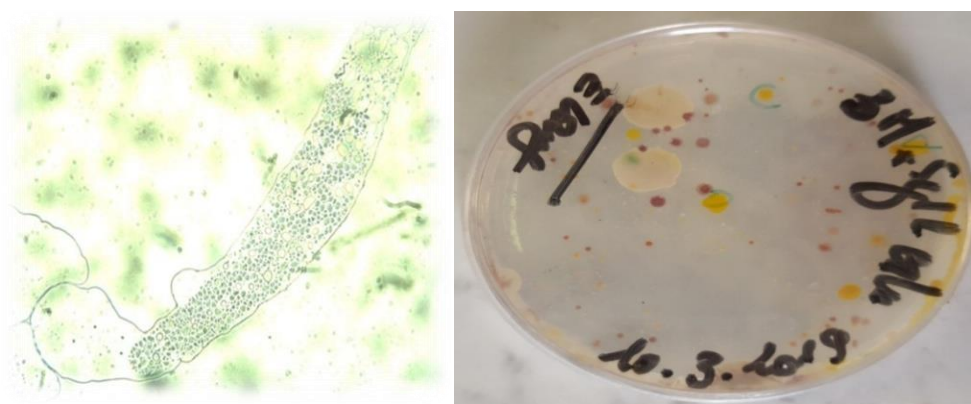
Le tableau (5.1) donne les paramètres physicochimiques des eaux prélevées. Il ressort après analyse des données que les eaux de la zone de prélèvement sont douces et à pH = 7,03.

**Tableau 5.1 :** Caractéristiques physicochimiques des eaux de prélèvement de *Metlili*

Paramètres	
pH	7,03
Redox (mVoRP)	278,3
Oxygène dissous (%)	57,1
Oxygène dissous (ppm)	5,01
Conductivité ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )	4521
Conductivité absolue ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )	4027
Résistivité $\text{M}\Omega.\text{cm}$ )	0.0002
TDS (ppm)	2261
Salinité (psu)	2,42
Température ( $^{\circ}\text{C}$ )	19,24
Pression atmosphérique (psi)	14,038

### 5.3 Répartition et prolifération des microalgues

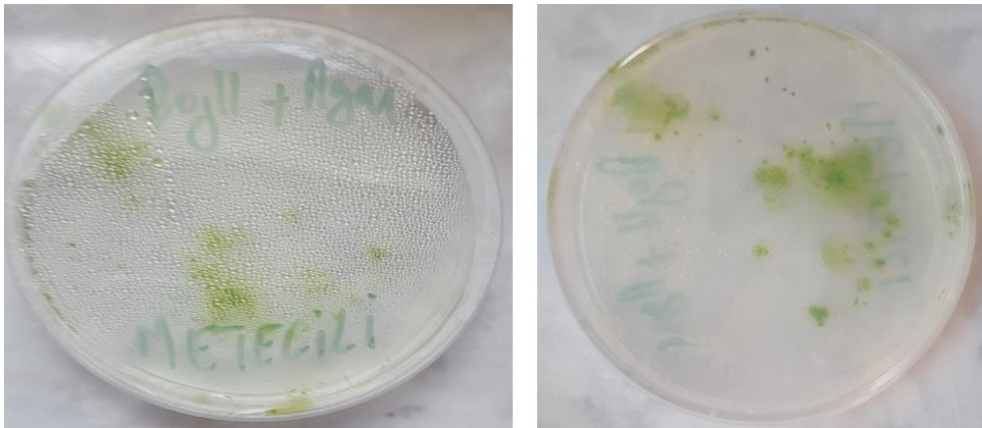
La présence de microalgues dans nos échantillons est confirmée par l'image de gauche de la figure (5.1).



**Figure 5.1 :** Micrographie de l'algue présente dans nos échantillons (Gx20, image de gauche) Colonies de couleurs jaune et jaune orangé de l'algue (image de droite)

Une fois la présence de microalgues confirmée, nous avons procédé à l'isolement et la purification des souches durant un mois. Après la période d'incubation, plusieurs colonies d'aspect et de consistance différents apparaissent dans les boîtes de Pétri : jaunâtres, lisses, rondes, légèrement bombées, à aspect crémeux et à pourtour régulier ou irrégulier. Selon les souches, la taille des colonies varie de petite à un peu plus grande (figure 5.1).

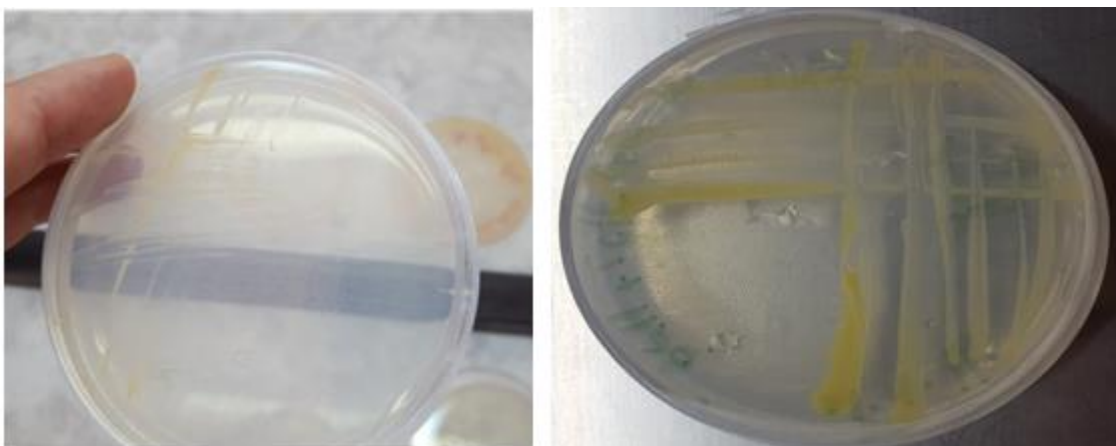
L'influence du milieu d'isolement sur la morphologie des microalgues est étudiée sur les deux milieux : BG11 simple et BG11 modifié. Les résultats obtenus montrent l'apparition de colonies toutes de couleur verte comme le montre la figure (5.2).



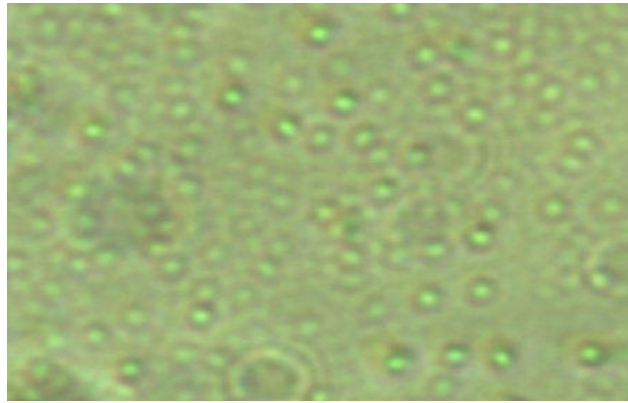
**Figure 5.2 :** Colonies de couleurs vertes sur le milieu BG11 seul

#### 5.4 Principales espèces de microalgues identifiées

L'identification des espèces est faite par des observations plus approfondies au microscope optique équipé d'un logiciel pour l'analyse et le traitement numérique des données. Chaque colonie prélevée sera apparentée à l'espèce correspondante et lui sera attribuée un code (figures 5.3 et 5.4).



**Figure 5.3 :** Purification des souches de *Chlorella* sur milieu BG11 modifié par Ghobrini



**Figure 5.4 :** Micrographie de *Chlorella vulgaris* G12 localement isolée

### 5.5 Développement de la souche *Chlorella vulgaris* G12 sur BG11 et le lactosérum

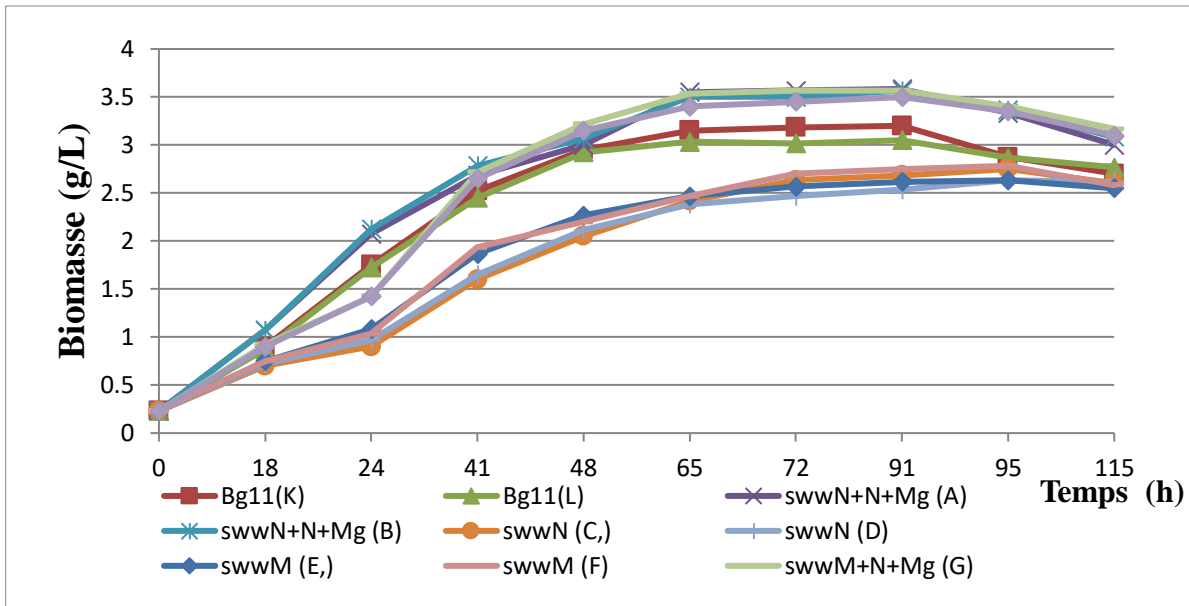
La figure (5.5) illustre la cinétique de croissance de la souche *C. vulgaris* G12 dans les différents milieux utilisés au cours du temps. Il ressort bien que la souche de chlorelle peut se développer dans du lactosérum. Toutefois, les résultats obtenus sont inférieurs à ceux réalisés sur le milieu BG11. Néanmoins, l'addition de l'azote et du magnésium au lactosérum a fait augmenter la productivité de telle sorte que les résultats obtenus sont supérieurs par rapport au milieu BG11. La phase stationnaire est atteinte au bout de 3 jours sur du lactosérum seul et modifié avec une concentration de biomasse de l'ordre de 3.5 g/L. Tandis qu'au niveau du milieu BG11 la biomasse avoisine les 3.2 g/L.

Cela signifie que l'ajout des deux sels influe positivement sur la production de biomasse. Selon Ghobrini et *al.*, (2017) et Ghobrini et *al.*, (2018) l'ajout de sels au niveau du lactosérum est indispensable pour un bon rendement des cultures. Toutefois, pour une meilleure utilisation du lactosérum comme support de culture, il serait plus judicieux de réaliser des prédictions statistiques sur l'addition des sels majeurs (N, Mg et P) par l'utilisation de logiciel du type *Design Expert* afin de déterminer l'optimum et la concentration des sels à additionner au lactosérum pour une meilleure productivité (Ghobrini et *al.*, 2017; Ghobrini et *al.*, 2018). Dans notre cas les valeurs de l'azote ( $\text{NaNO}_3$ ) et du magnésium ( $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ ) ont été additionnées sur la base de leur teneur au niveau du BG11 sur la base des travaux de Ghobrini et *al.* (2015).

L'ajout de  $\text{NaNO}_3$  et de  $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$  est motivé par le fait que l'azote et le magnésium rentrent en compétition avec le phosphore contenu dans le lactosérum de manière directe et/ou indirecte dans le développement cellulaire comme :

- La fabrication des chaînes d'ADN ;
- La Formation des protéines (acides aminés) ;
- La division cellulaire ;
- La formation de l'ATP.





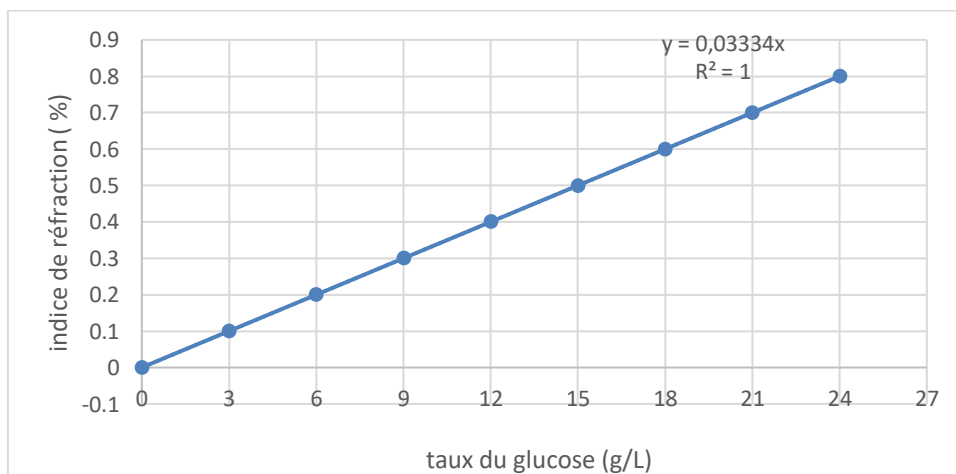
**Figure 5.5** : Evolution de la biomasse dans les différents milieux étudiés

Les différentes phases de croissance ne sont, toutefois, pas toujours aussi distinctes les unes des autres. Quelque fois, certaines peuvent se raccourcir ou se prolonger les rendant ainsi plus difficilement repérables. Dans notre cas, nous sommes dans la phase de croissance exponentielle au bout de trois jours avant la saturation (phase stationnaire). C'est dans cette phase que les lipides et les glucides peuvent s'accumuler.

Enfin, dans la phase de décroissance (91 h), la plupart des cellules ont épuisé leurs réserves intracellulaires de composants et elles n'auront plus suffisamment d'énergie à leur disposition pour poursuivre la maintenance cellulaire et meurent (phase de déclin).

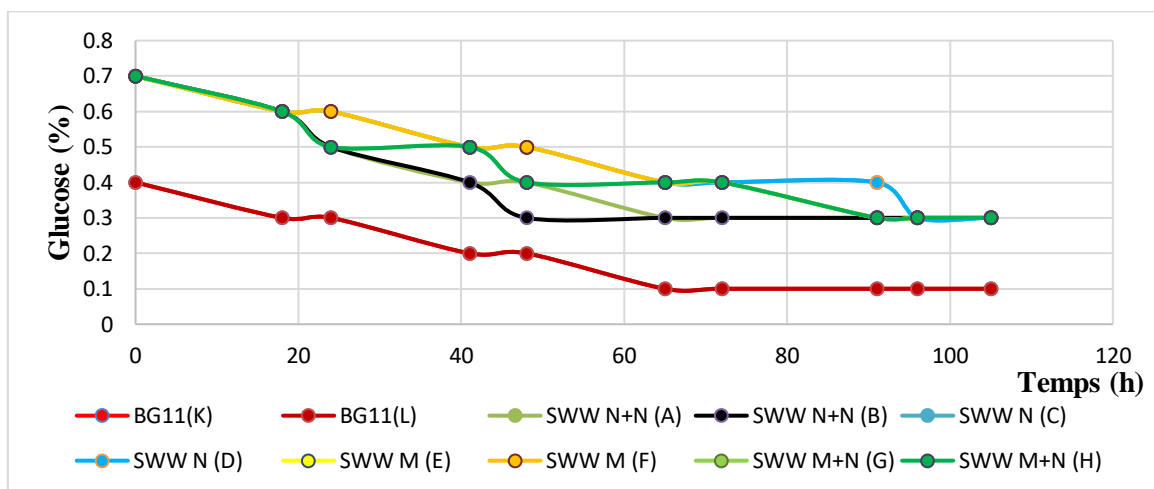
### 5.6 Evolution des sucres

La quantité de sucre contenue dans le lactosérum mais aussi dans les milieux de culture est obtenue en continu à l'aide du refractomètre décrit dans le chapitre 4 et ce, après étalonnage de l'appareil (Figure 5.6).



**Figure 5.6** : Courbe d'étalonnage pour la détermination de taux du glucose (g/L)

L'évolution de l'assimilation du glucose au niveau des différents milieux de culture est regroupée dans la figure (5.7). Il apparaît nettement, que la concentration en sucre dans les trois milieux diminue progressivement au cours de l'expérience. Toutefois, cette diminution est plus rapide dans le cas du milieu BG11 que dans les autres milieux. Aussi, la concentration en sucre diminue plus rapidement dans le milieu du lactosérum naturel que dans le milieu du lactosérum hydrolysé. Le taux de sucre résiduel à la fin de l'expérience se stabilise à 0,1 % pour le milieu BG11 et à 0,3 pour les autres milieux. Ce qui signifie que le lactosérum contient aussi des sucres qui sont majoritairement complexes, principalement du lactose. Comme les cellules de *C. vulgaris* G12 ne consomment que les sucres simples comme le glucose, une grande quantité de sucre reste dans le milieu. Il serait donc préférable d'hydrolyser les sucres présents au niveau du lactosérum et de s'en servir comme matière organique assimilable par les chlorelles afin de se passer de l'ajout du glucose dans le milieu et ainsi réduire les coûts de production.

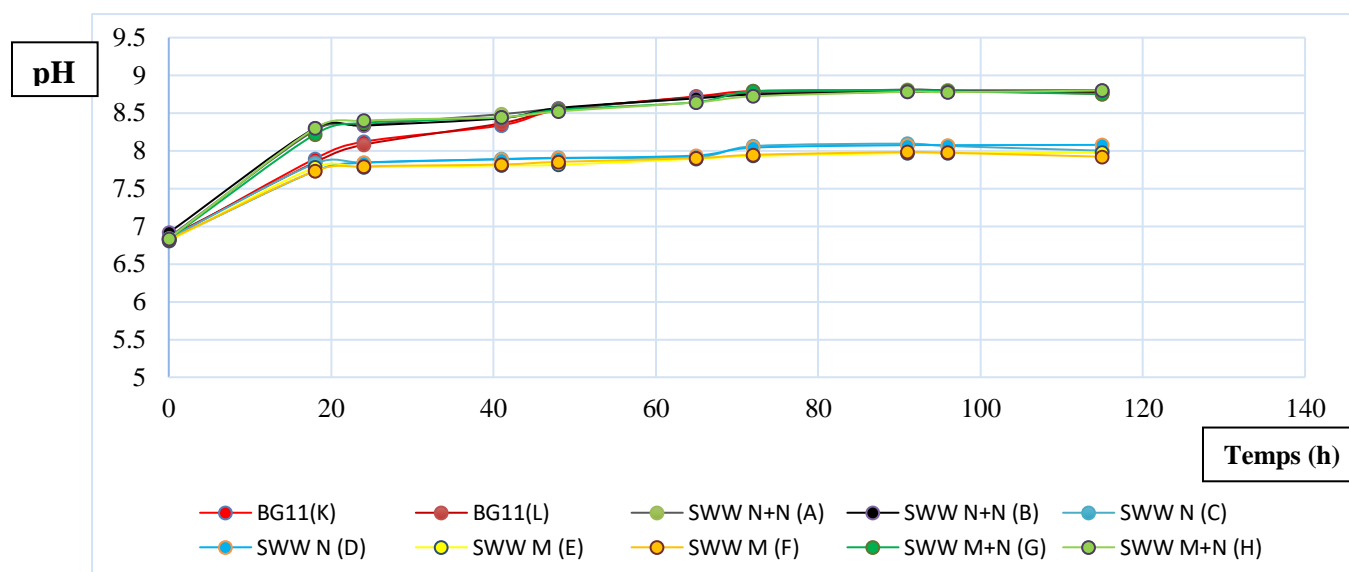


**Figure 5.7 :** Evolution de l'assimilation du glucose

### 5.7 Effet du pH

Les valeurs enregistrées, lors de nos expériences, montrent que le milieu du lactosérum (naturel ou hydrolysé) auquel est additionné de l'azote ou du magnésium est plus basique que les milieux contenant le lactosérum sans aucun ajout de sels (figure 5.8).

Au vu de ces résultats, nous constatons aussi que les valeurs du pH se maintiennent dans la zone (7,5-9) où les cultures se déroulent dans de bonnes conditions et sans contamination. En effet, au-delà de cet intervalle, il y a risque d'avoir des contaminations dans la culture. Les valeurs plus proches de la valeur optimale de pH (8,8) sont obtenues sur les milieux BG11 et ceux de lactosérum additionnés d'azote et de magnésium.



**Figure 5.8 :** Evolution du pH

## 5.8 Calcul de productivité

Le calcul est effectué sur la base de l'expression suivante, et les résultats de calcul sont donnés dans le tableau (5.2).

$$P = \frac{\text{val max} - \text{val min}}{\text{temps}}$$

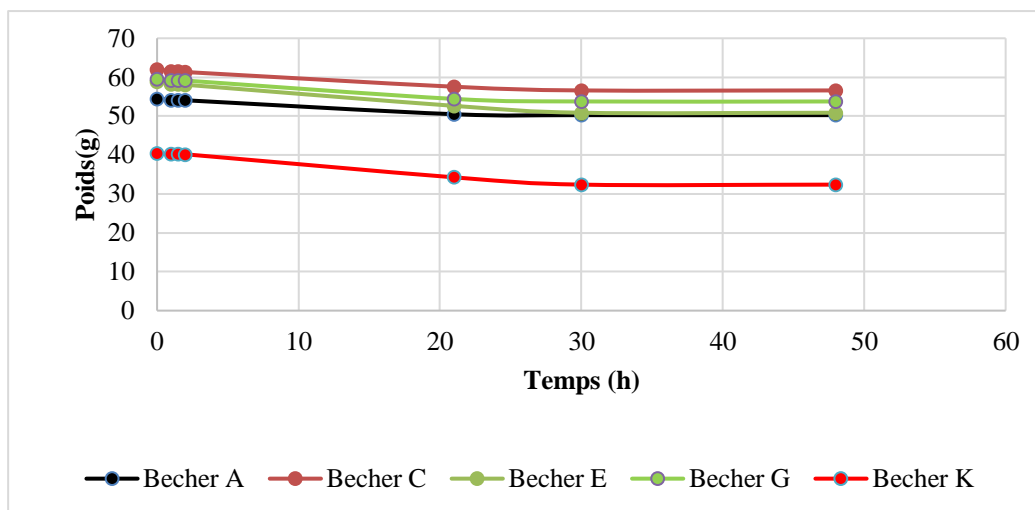
Ces résultats révèlent que le lactosérum seul ne peut rivaliser avec le BG11. Par contre, le lactosérum hydrolysé et modifié additionnés du N et Mg donne un meilleur rendement. Ce dernier pourrait donc être présenté alternative aux milieux traditionnels (Ghobrini et *al.* 2017).

**Tableau 5.2 :** Productivité de la souche *C. vulgaris* G12 dans les milieux testés

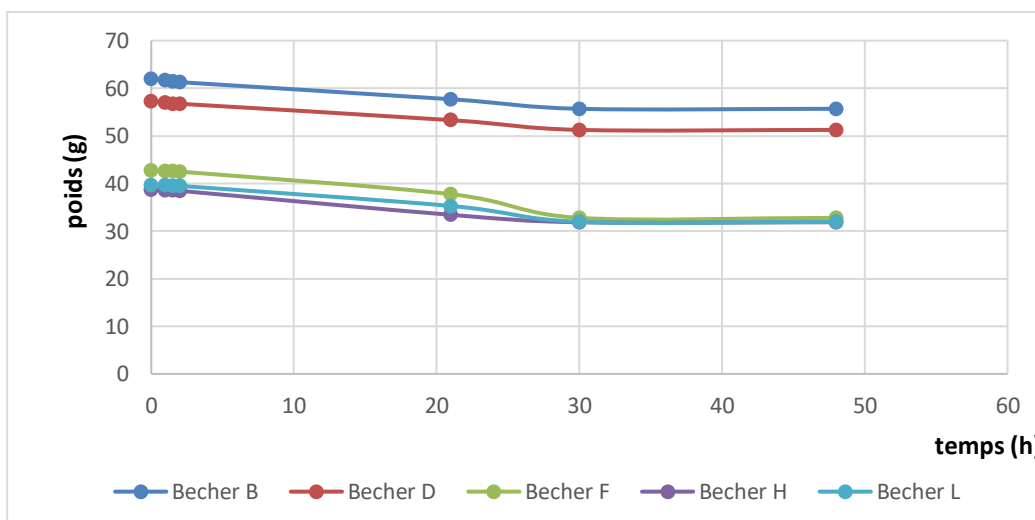
Milieu	BG11 (K)	BG11 (L)	SWWN+ N+Mg (A)	SWWN+ N+Mg (B)	SWWN (C)	SWWN (D)	SWWM (E)	SWWM (F)	SWWM+ N+Mg (G)	SWWM+ N+Mg (H)
Biomasse (g/h)	0,033	0,031	0,037	0,0367	0,026	0,025	0,021	0,022	0,0367	0,036

### 5.9 Séchage en étuve et séchoir solaire indirect pour la biomasse produite

Le séchage est une opération unitaire qui consiste à éliminer tout ou en partie d'un solvant (en général de l'eau) contenu dans un produit humide, le plus souvent solide ou pâteux. L'évolution du poids de la biomasse lors de séchage assisté par l'étuve est présentée dans la figure (5.9) et celle réalisée sous solaire indirect dans la figure (5.10).



**Figure 5.9 :** Résultats de séchage assisté par l'étuve



**Figure 5.10 :** Résultats de séchoir solaire indirect

Comme tous les traitements thermiques, le séchage entraîne des pertes d'arômes, de vitamines, de pigments (Fournier, 2003), des modifications irréversibles de texture et donc de capacité à la réhydratation. Aussi, l'opération pourrait facilement aboutir à une perte considérable du produit et de la qualité nutritionnelle (Ratti, 2009).

Pour une meilleure gestion de l'opération de séchage, il serait souhaitable de compléter ce travail à l'aide des techniques d'analyses performantes telle que la HPLC afin d'en déterminer les meilleures conditions.

### 5.10 Extraction des lipides

Le but de cette étape est d'aller chercher les lipides, notamment les acides gras présents dans les cellules algales. L'extraction est réalisée selon le protocole de Bligh et Dyer (1959) modifié par Ghobrini et *al.* (2017). Le tableau (5.3) résume les quantités de lipides extraites pour les différents milieux de culture utilisés.

**Tableau 5.3 :** Lipides extraits pour les différents milieux

Milieu	BG11 (K)	BG11 (L)	SWWN+ N+MG (A)	SWWN+ N+MG (B)	SWWN (C)	SWWN (D)	SWWM (E)	SWWM (F)	SWWM+ N+MG (G)	SWWM+ N+MG (H)
Lipide (mg)	107	76	59	51	77	73	101	88	80	47
Biomasse algale sèche (mg)	0,486	0,490	0,215	0,232	0,468	0,442	0,540	0,497	0,263	0,180
Proportion (%)	22,02	15,51	27,44	21,98	16,45	16,51	18,70	17,71	30,41	26,11

Les proportions de lipides ont été calculées selon l'expression :

$$\text{Teneur en lipides} : = \frac{m(\text{lipide})}{m(\text{sec})} \times 100$$

$$\text{D'où la Teneur totale en lipides} = \frac{m(\text{huile})}{m(\text{biomasse})} \times 100 = \frac{0,759}{3,58} \times 100 = 21,2 \%$$

m (huile) en gramme, m (biomasse) en gramme.

Les meilleurs résultats sont donc obtenus dans le cas des milieux lactosérum naturel et modifié. Tandis que pour les milieux BG11, lactosérum naturel et hydrolysé la quantité de lipide extraite dans les mêmes conditions de travail est moyennement faible par rapport à celle obtenue au niveau du lactosérum additionné d'azote et de magnésium.

Ainsi, nous avons obtenu un bon résultat en rendement par rapport à la quantité produite. Ainsi, l'utilisation des billes et le méthanol dans ce procédé été pour faire casser les parois et faire perforer la membrane et faire sortir le maximum de lipides. Alors que, l'utilisation du chloroforme a pour but de former un complexe avec les lipides et ainsi faciliter leur extraction.

Il existe plusieurs techniques d'extraction et de récolte des microalgues. Cependant, nous ne pouvons actuellement identifier la technique idéale à utiliser puisque l'efficacité de celle-ci dépend grandement de l'espèce microalgale utilisée (concentration en biomasse, diamètre, caractéristiques morphologiques, etc.), de la valeur du produit désiré qui doit être compétitif au prix du baril ainsi que des coproduits générés permettant une meilleure rentabilité du processus. De plus, l'extraction et la récolte influencent présentement la rentabilité du processus de production de biodiesel en raison des coûts élevés généralement associés aux techniques aujourd'hui disponibles (Cantin, 2010). En effet, la récolte représenterait de 20 à 30 % du coût total de production de biodiesel, alors que l'extraction représenterait 50 % des coûts de production (Pienkos et Darzins, 2009). Une meilleure connaissance des espèces microalgales permettra d'ailleurs d'identifier des solutions d'extraction spécifiques, efficaces et peu coûteuses en fonction de l'espèce utilisée.

Il est toutefois possible de faire certaines constatations. En effet, au niveau des techniques disponibles pour la récolte des microalgues, la centrifugation serait maintenant la technique la plus utilisée (Benemann et *al.*, 1980 ; Mohn, 1980 ; Richmond, 1986) . Toutefois, étant donné qu'elle est très dispendieuse et énergivore, elle serait à privilégier uniquement pour les produits à haute valeur dont notamment les nutraceutiques et les cosmétiques. Puisque le biodiesel est un produit de faible valeur, la centrifugation entraînerait une augmentation importante des prix de ce biocarburant. Comme la production de biodiesel à partir de microalgues de métabolisme hétérotrophe devra s'orienter sur la vente des coproduits ayant une valeur de revente élevée, cette orientation permettra peut-être de rentabiliser une technique telle que la centrifugation. De plus, puisque cette technique n'entraîne pas de contamination chimique ni de changements dans la composition cellulaire des microalgues, il s'agit d'une technique efficace permettant de générer des coproduits à haute valeur pouvant servir à l'alimentation humaine et animale dont notamment les nutraceutiques. Cette technique serait d'ailleurs adaptée à la production de biodiesel à grande échelle (Mata, 2010).

Une technique telle que la filtration pourrait être utilisée, mais ce, uniquement pour les microalgues formant des colonies ou encore filamenteuses telles que *Spirulina sp.* Ou *Micractinium sp.* (Lee et *al.*, 2008). En effet, les microalgues de très faible diamètre telles que *Chlorella sp.* provoquent l'obstruction des filtres utilisés et nécessitent le changement fréquent de ces derniers. Ces manipulations entraînent ainsi une augmentation des coûts tout comme une augmentation de la durée nécessaire à la récolte.

### 5.11 Transestérification et caractéristiques du biodiesel produit

À partir des résultats du tableau (5.7) le calcul de la quantité des lipides totale extraite nous donne 0,759g

Ainsi vient la quantité de biodiesel obtenu qui est calculée comme suit :

$$m(\text{biodiesel}) = 21,1877 - 20,6585 \quad \Longrightarrow \quad m(\text{biodiesel}) = 0,5292\text{g}$$

$$\text{Avec } m(\text{tube vide}) = 20,6585 \text{ g}$$

De ce fait, le rendement obtenu de la réaction de Transestérification est de :

$$R(\%) = \frac{m(\text{biodiesel})}{m(\text{huile})} \times 100 \quad \Longrightarrow \quad R = 69,7\%$$

Par ailleurs, pour obtenir des données sur la nature de biodiesel et certains cas pour l'identifier, nous procédons à l'étude de ses propriétés physicochimiques (tableau 5.4) qui s'attachent surtout à la détermination de la densité, l'indice de réfraction, pH, etc...

**Tableau 5.4 :** Caractéristiques de biodiesel obtenu

Caractère	Biodiesel	Diesel	Norme mondiale du biodiesel
Masse volumique (g/cm <sup>3</sup> )	0,882	0,81 à 0,89	0,86 à 0,89
pH ; T: 16 °C	4,805	5,5 à 8,0	neutre
n <sup>20</sup> ; T: 16°C	1,452	1,444 à 1,484	-

Les résultats obtenus lors de ce travail montrent que notre biodiesel a des caractéristiques très voisines de celles d'un carburant fossile ainsi que d'un biodiesel à norme mondiale. D'ailleurs, la masse volumique obtenue pour notre produit appartient à l'intervalle de celle d'un biodiesel et d'un carburant fossile. Tandis que le pH a une valeur un peu moins de celle d'un diesel fossile et cela c'est parce que nous avons travaillé avec de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1%) à 98% concentré. Il est important de signaler que le manque de certains tests revient à la production de quantité de biodiesel qui est faible.

À cet égard, et à partir de ces résultats, nous pouvons dire que notre objectif est atteint vu que le biodiesel obtenu est conforme avec celui issu de l'énergie fossile, et donc il peut nous servir à l'avenir.

# **Conclusion et perspectives**



La méthode adoptée pour l'isolement et la purification de microalgues locales a permis d'obtenir des souches purifiées de chlorelles de couleur jaune suite à une réorientation du métabolisme de la souche isolée induite par la modification de la composition du milieu de culture BG11 par Ghobrini (non publiée) lors de l'isolation des colonies. Par ailleurs, les modifications du milieu pour l'isolement et la purification de la souche jaune *Chlorella vulgaris* G12 ont permis de réduire les temps d'apparition des colonies (**5 à 7 jours**) et de purification de la souche basée sur le principe des repiquages répétés sur boîtes de Pétri (maximum après **2 à 3 jours**). De plus, l'isolation et la purification de souche jaune est appréciée par les industriels du fait de l'absence de la chlorophylle qui peut influencer sur la qualité du produit biologique recherché.

Le but de ce travail était d'évaluer l'influence de deux milieux de culture à savoir le BG11 et le lactosérum sur la productivité en termes de biomasse et sur la production de lipides chez la souche jaune *Chlorella vulgaris* G12. Les résultats ont montré que l'utilisation du lactosérum peut remplacer l'usage d'un milieu de synthèse comme le BG11 pour la culture de la souche de chlorelle localement isolée. En effet, l'addition d'une source d'azote et du magnésium au lactosérum, qu'il soit hydrolysé ou non, a augmenté le rendement en biomasse et de façon significative, respectivement **0,0367 g/h** et **0,037 g/h** comparativement au milieu BG11 où la productivité était de **0,033 g/h**. Ainsi, la valorisation du déchet laitier, par son utilisation, permet d'une part de réduire les coûts de production de la biomasse algale, en effet, ce dernier influe significativement, au final, sur le prix du biodiesel algal mais d'autre part permet de réduire ce type d'effluents tout en réduisant considérablement leur impact environnemental. Par ailleurs, la variation de la teneur en lipides obtenus dans les différentes conditions de culture sous lactosérum est non significative par rapport à la culture sous BG11 et elle représente environ **20 %** de la biomasse algale produite. En outre, il est important de signaler que cultiver des microalgues en mode nutritif hétérotrophe a permis : une augmentation de la productivité dans les cultures, de réduire leurs temps, d'éviter les contaminations et de diminuer le coût de production en absence de lumière. Ainsi et de façon globale, les résultats obtenus dans ce projet se sont avérés très satisfaisants et ont permis de montrer que la valorisation d'un effluent issu de l'industrie agroalimentaire reste faisable et rentable.

Pour parfaire notre travail, il serait plus judicieux de réaliser des prédictions statistiques par l'utilisation de logiciel du type *Design Expert* afin de déterminer l'optimum et la concentration des sels à additionner au lactosérum pour une meilleure productivité.

Par ailleurs, l'utilisation de l'HPLC facilitera la détermination du taux et du type de sucres présents au niveau du lactosérum, et cela, pour une meilleure utilisation de ses sucres, mais aussi pour une bonne quantification et un meilleur suivi de la teneur en sucre durant la culture.

De même, l'usage de la CPG-SM permettra de déterminer la qualité des acides gras présents au niveau de la souche objet de notre étude ce qui rendra leurs valorisations plus ciblées.

## BIBLIOGRAPHIE

### A

ABDENNADHER, M. Étude Taxonomique et Eco physiologique des dinoflagellés toxiques du Golfe de Gabès : *Alexandrium minutum*, *Prorocentrum lima*, *Cooliaspp.* Et *OStreopsis ovata*.

Thèse de doctorat : Tunisie : Université de Sfax. 2014, 244 p.

ABERT VIAN, M., DEJOYE TANZI, C., CHEMAT, F. Techniques conventionnelles et innovantes, et solvants alternatifs pour l'extraction des lipides de micro-organismes. OCL 2013, 20(6) D607.

ADRIAN, J., LEGRAND, G., et FRANGNE, R. Dictionnaire de biochimie alimentaire et de nutrition. Lavoisier. 3ème édition. Technologie et doc, 1991, 116p.

ALAIN, G. Étude d'opportunité des biotechnologies marines sur la production et l'utilisation des microalgues, Rapport commandité par la SODIM. 2006 44 p.

ALAIS, C. Principes des techniques laitières, sciences du lait : La valorisation de lactosérum. 3ème édition. Masson. Paris: 1975. p. 7-10.

ALPTEKIN, E. et CANAKCI, M. Determination of the density and the viscosities of biodiesel-diesel fuel blends. Renewable Energy, 2008, volume 33, numéro 12, p. 2623-2630.

ANDERSEN, R.A. Algal Culturing Techniques. Academic Press, 2005

AREVALO, A.T. Etude environnementale comparative des procédés de valorisation du lactosérum. 97 p.

Mémoire de maîtrise : génie agroalimentaire : Université Laval : 2017.

ASTM Standard D6751-10. Standard specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels. [En ligne]. [Consulté le 20 mai 2019]. Disponible sur : <[www.astm.org](http://www.astm.org)>

### B

BALDASSO, C., BARROS, T.C and TESSARO, I.C. Concentration and purification of Whey proteins by ultrafiltration. Elsevier, 2011, volume 278, Issues 1-3, p. 381-386.

BASTIEN, A., GIRARD, JM, CARTIER, S., BENYAGOUB, M., G. V. Valorisation industrielle des microalgues : état de la situation en 2013.

BECKER, E.W. Microalgae as a source of protein. Biotechnology Advances 25, 2007, p.207-210.

BENEMANN, J.R., KOPMAN, B.L., WEISSMAN, D.E., EISENBERG, D.E., GOEBEL, R.P. Development of microalgae harvesting and High rate pond technologies in California. *Algal biomass*, 1980, p.457.

BENEMANN, JR. CO<sub>2</sub> mitigation with microalgae systems. *Energy Conversion et Management* 38: S475-S479 Benemann J, Feasibility analysis of photobiological hydrogen production. 1997.

BLANCHARD, B. D. dairy food and environmental sanitation 11 (9), 1991, p. 494.

BLIGH, E.G. DYER, W.J.A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J Biochemistry Physiology* 1959, p.911.

BOYAVAL, P., TERRE, S., CORRE, C. Production d'acide lactique à partir de perméat de lactosérum par fermentation continue en réacteur à membrane : Le Lait, INRA Editions, hal-00929119 ; 1988, p.75.

BOZBAS, K. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2008, volume 12, 2, p. 542-552.

## C

CANTIN, Isabelle. La production de biodiesel à partir des microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe : Rendement des procédés d'extraction et de récolte, p52.

Thèse de maître : Environnement : Canada : Université de Sherbrooke : 2010.

CASTILLE, F.J. et *al.*, High-cell Density Cultivation of Disaccharides in Oxygen limited Batch Culture, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 49, 1996, p.621-628.

CHAMOUMI, Mostafa. Optimisation de la production du biodiesel à partir d'huiles de microalgues et d'huiles usées. 89 p.

Mémoire de maîtrise : Environnement : Québec, Canada, Université de Sherbrooke : 2013.

CHEN M., CHEN X., LIU T. ZHANG W. Subcritical Ethanol Extraction of Lipid from Wet Microalgae Paste of *Nannochloropsis sp.* *Journal of Bio based Materials and Bioenergy* 5, 2011, p.385.

CHERYAN, M. ultrafiltration and microfiltration handbook. Technomic publishing Company, Lancaster, PA, 1998.

CHEVANTON, M. Interactions microalgues-bactéries en système expérimental bispécifique : effets sur la croissance de *Dunaliella Sp.* Thèse de doctorat, Ecole Doctorale Vénam, Université de Nantes, 2013, p.198.

CHISTI, Y. "Biodiesel from microalgae," *biotechnology advances*, May, 2007, vol. 25, n°. 3, p. 294-306.

CHOJNACKA KATARZYNA M.-R.F.-J., "Kinetic et Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae," *Biotechnology*, vol.3, 2004, p.21-34

CHRISTIANSEN, K. F., VEGARUG, G., LANGSRUD, T. and ELLEKJAER, M. R. stabilizers in High pressure processed depressing. *Food hydrocolloid* 18, 2004, p. 757.

CLAUDE, P. Quelques particularités biologiques : Les formes et la reproduction des algues. [En ligne].2008. (Disponible sur) « [www.atolls-polynesie.ird.fr/ecorecat/algform.htm](http://www.atolls-polynesie.ird.fr/ecorecat/algform.htm) » (consulté le 27/05/2019)

## D

DAMODARAN, S. protein stabilized foams and emulsions, in Damodaran. & Paraf, (Eds), *food proteins and their application*. New York, USA: Marcel Dekker Inc, 1997, p. 57- 110.

DA-SILVA, T.L., GOUVEIA, L. and REIS, A. Integrated microbial processes for biofuels and high value-added products: the way to improve the cost effectiveness of biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 2014, p. 1043–1053.

DEJOYE TANZI, Céline. Eco-extraction et analyse de lipides de microalgues pour la production d'algocarburant. Thèse de Doctorat : Chimie : France, Université d'Avignon : 2013, p.25-46.

DEMIRBAS, A. Economie and environmental impacts of the liquid biofiels. *Energy education science and technology*, 2008, volume 22, p. 37-58.

DEMIRBAS, A. and DEMIRBAS, M. F. *Algae Energy*. London : Springer London, 2010.

DE REVIERS, B. *Biologie et phylogénie des algues*. Edition Belin, 2002. Tome 1. 351p.

DE WITT, J.-N. *Manuel De l'Enseignant sur le lactosérum et les produits de lactosérum*. 1ère édition. Bruxelles, Belgique : European Whey Products Association, 2001.

## E

EIA, Energy Information Administration (EIA). *Energy outlook*. [En ligne]. 2009.

[Consulté le 15 mai 2019]. Disponible sur : < [http://www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/pdf0484\(2009\).pdf](http://www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/pdf0484(2009).pdf) >

## F

FERNANDO, S., KARRA, P., HERNANDEZ, R. and JHA, S.K. Effect of incompletely converted soybean oil on biodiesel quahty. *Energy*, 2007, volume 32, p. 844-851.

FOURNIER, V. Conservation des aliments. Thèse de doctorat, Université Laval, Canada : 2003, p.16.

## G

GANNA, S., TOUZI, A. Valorisation du Lactosérum par la Production de Levures Lactiques avec les Procédés de Fermentation Discontinue et Continue : Milieux de culture, Reviews Energy Renewable : Production et Valorisation – Biomasse, 5158, 2001, p.52.

GAYRAL, P. Les algues : morphologie - cytologie - reproduction écologie. Paris : Doin éditeurs, 1975. 167p.

GERARD, B., et DERBY, G. Lait nutrition et santé. Ed Tec et Doc, 2001, p. 44-55.

GHOBRINI D., BRANYIK T., KEBBAB L., POUTOUT B. and AIBOUD K. Cultivation of *Chlorella vulgaris* Using Medium From a Dairy Effluent. *IEEE Explore* (Conférences Publication) (2019). DOI : [10.1109/IRSEC.2018.8702962](https://doi.org/10.1109/IRSEC.2018.8702962)

GHOBRINI D., KEBBAB L. et AIBOUD K. Journée d'étude en biochimie : Composés biologiques actifs synthétisés par les microalgues, Le 29 Janvier 2018, Ghardaïa, Université de Ghardaïa.

GHOBRINI D., BRANYIK T., YAKOUB-BOUGDAL S., AIBOUD K. BioTech 2017, and 7<sup>th</sup> Czech-Swiss Symposium: Heterotrophic cultivation of *Chlorellavulgaris* on saline wastewater from dairy industry, 13-17 June 2017, Biotechnology: Prague, Czech Republic.

GHOBRINI D., BRANYIK T., YAKOUB-BOUGDAL S. et AIBOUD K. 1<sup>er</sup> Journée d'Étude sur l'Environnement Aride : Effet de la lumière bleue et rouge sur la production de biomasse et de lipide chez une microalgue verte *Dunaliella tertiolecta* souche isolée à l'Oued El Malah (Djelfa région steppique de l'Algérie), 19 Avril 2016, Ghardaïa , Université de Ghardaïa.

GHOBRINI D., YAKOUB-BOUGDAL S., AIBOUD K. and DAOUD D. Effect of red light on biomass productivity of green microalgae *Chlorella sp.* Strain isolated from Djurdjura national park (north Algeria). 2<sup>nd</sup> Symposium on Medicinal and Aromatic Plants of Mediterranean, 22 – 25 April 2015, Antalya, Turkey.

GHOBRINI D., AIBOUD K., KEBBAB L., KOUMAD L. and YAKOUB-BOUGDAL S. Bioethanol production from waste of date by solid-state fermentation. *Revue des Energies Renouvelables*, SIENR'12 Ghardaïa, 2012, p. 109 –114.

## H

HESLOT, H. L'ingénierie des protéines et ses applications. *Lavoisier Tec et Doc*, 1996. p. 424-432.

HU, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. Microalgal triacyl glycerols as feed stocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 2008, p.621-639.

### I

ILKER, E., MUSHSIN, C. and SEBNEM, H. separation of whey Components by using ceramic composite membranes. 2006, p. 189.

Institut Français du Pétrole (IFP). L'évolution de la demande énergétique. [En ligne]. 2008. [consulté le 14 mai 2019]. Disponible sur : <<https://www.ifpenergiesnouvelles.fr/>>

### J

JAUZEIN, C. Paramétrisation de la nutrition azotée et phosphorée d'*Alexandrium catenella* microalgue toxique responsable d'efflorescences dans la lagune de Thau, 2009.

JOHNSON, M.B. et WEN, Z. Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct Transestérification of algal biomass. *Energy Fuels*, 2009, volume23, p. 5179-5183.

JOUAN, P. Lactoprotéines et lactopeptides : propriétés biologiques. Edition Quae. 2002. 127p.

### K

KALLEL, H. et *al.*, Optimisation d'une Culture Continue de *K. fragilis* sur un Ultrafiltrat de Lactosérum. Influence des Minéraux et de Vitamines sur la croissance et le Métabolisme, *Reviews Microbiology Aliments - Nutrition*, 1991. Vol. 9, p.309-317.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel : A comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2011, volume 36, numéro 3, p. 364-373.

KNOTHE, G. KRAHL, J. et GERPEN, J. V. Cetane numbers-heat of combustion-why vegetable oils and their derivatives are suitable as a diesel fuel, *The biodiesel handbook*. Campaign, Illinois, USA: AOCS Press, 2005, p.72-80.

KOBERG, M., COHEN, M., BEN-AMOTZ, A. and GEDANKEN, A. Biodiesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresource Technology*, 2011, volume 102, p. 4265-4269.

KOSIKOWSKI, F. V. Whey Utilization and Whey Products1. *Journal of Dairy Science*, 1979, vol .62.(7), p.1149-1160.

KOYUNCU, I., TURAN, M., TOPACIK, D. and ATES, A. water science and technology 41(1), 2000, p. 213.

## L

LAROSIERE, Barbara. Etude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO<sub>2</sub> : La culture en batch. 29p Thèse de Doctorat : Sciences pour l'ingénieur : France, École Centrale des Arts et Manufactures de PARIS : 2012.

LAPLANCHE, J., DUCOGNON, V., et TREVUSAN, D. Traitement du lactosérum par filtration surcom post ensemencé de vers, épuration of lactosérum in a compost filter with worms, syndicat des apagistes, fruits communs et vendeur direct de Savoie, mais onde l'agriculture-73/90 SAUT BALDOPH.2006.o

LAPUERTA, M., FERNANDEZ, J.R., et de MORA, E. Correlation for the estimation of the cetane number of biodiesel fuels and implications on the iodine number. Energy Policy, 2009, volume 37, p. 4337-4344.

LEE, A.K., LEWIS, D.M., ASHMAN, P.J. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. Journal of applied phycology, 2008. vol. p.558-567.

LI Y., NGUYEN, T.H.M., SAHUT, C., BEISSON, F., CUINE, S., MIRABELLA, B., VERDIER, G., ADRIANO, J.M., AUROY, P., BEYLY, A., BILLON, E., CARDETTINI, V., CARRIER, P., PUPPO, R. et PELTIER, G. Production de lipides par les Microalgue [en ligne].

Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des bactéries et microalgues : 2010. [Consulté le 20 mars 2019]. Disponible sur :<<http://www-heliobiotec cea.fr/documents/poster-lb3m-lipides-17Mai2010.pdf>>

LI, Z., JIANG, F., LI, Y., ZHANG, X., TAN, T. Simultaneously concentrating and pretreating of microalgae *Chlorella* spp. by three-phase partitioning Bioresource Technology 2013. vol. 149, p.286-291.

LINDEN, G., & LORIENT, D. Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole. Masson. Paris, Milan, Barcelone : 1994.

LIU, Z.-Y., WANG, G.-C., ZHOU, B.-C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Bioresource Technology 99, 2008, p.4717-4722.



LUAN, T.G., JIN, J., CHAN, S.M.N., WONG, Y.S., TAM, N.F.Y. Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process Biochemistry* 41, 2006, p.1560-1565.

LUPIN, D. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. FAO, Alimentation et nutrition.1998.p. 25-38.

LUQUET, F.M. et BOUDIER, J.F. Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. *Apria*, 21, 1984, p. 1-7, 66, 83-90.

## M

MARWAHA, S. and KENNEDY J.F. Review: whey pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science & Technology*, 23(4), 1988, p. 323-336.

MATA, T.M., MARTINS, A.A., CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, renewable and sustainable energy reviews, Jan.2010 vol. 14, no. 1, p.217-232.

MECHAKRA, A., AUBERGER, B., REMEUF, F. and LENOIR J. Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti* science. *Aliments*, 19. 1999, p.663-675.

MELANIE S. Opportunités de développement de la filière microalgues à l'île de la réunion ARER - Agence Régionale Energie Réunion - Association loi 1901 à but non lucratif Organisme de formation agréé Rapport de stage. , 2009.

MELIS Anastasios. HAPPE Thomas. Hydrogen Production. Green Algae as a Source of Energy. Department of Plant and Microbial Biology, 111 Koshland Hall, University of California, Berkeley, California94720-3102 (A.M.); and Botanisches Institut der Universita't Bonn, Karlrobert-Kreiten-Strasse 13, 53115 Bonn, Germany (T.H.) *Plant Physiology* 127. 2001, p740-748.

MIAO, X. et WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource technology*, 2006, vol. 97, n° 6, p. 841-846.

MICHAUD, Jean-Charles. Stratégie de culture algale en deux étapes afin de produire des biocarburants : Le Projet RTA et Le Projet VERTECH. 88 p.

Mémoire de maîtrise : Sciences et génie des matériaux : Québec, Canada, Université du Québec à Trois-Rivières : 2016.

MOHN, F.H. Experiences and strategies in the recovery of biomass from mass cultures of microalgae. *Algae biomass*, 1980, p. 547-571.

MOLETTA, R., Gestion des problèmes environnementaux dans les IAA. Paris : Tech et Doc, 2002, 600p.

MORABITO, Daniel (1994). Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* sur lactosérum : Etude cinétique, modélisation et stimulation de procédé intégré. 226 p.

Thèse de doctorat : Sciences agricoles : Institut National Polytechnique de Lorraine, 1994. Français. NNT : 1994INPL025Nff. tel-01751330f.

MOULIN, G. Etudes Physiologiques de *K. fragilis*, Conséquences pour la Production de Levures sur Lactosérum, *Le lait*, N°607. 1981, p.32-33.

## N

National Renewable Energy Laboratory. Biodiesel handling and use guide, 2009, p.1-56

NIGAM, P.S. and SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2011, volume 37, numéro 1, p. 52-68, ISSN 0360-1285

## O

OECD-FAO Agricultural Outlook. Perspectives agricoles de l'OECD-FAO 2011-2020. 2011, p. 159-173. 196 p.

## P

PANESAR, P.S., and KENNEDY, J.F. Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Critical reviews in biotechnology* 32 (4), 2012, p. 327-348.

PARK, J.B.K., CRAGGS, R.J., SHILTON, A.N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102, 2011, p35-42.

PERALES-VELA, H.V., PEÑA-CASTRO, J.M., CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64, 2006, p1-10.

PEREZ-GARCIA, O., ESCALANTE, F. M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. Heterotrophic cultures of microalgae : Metabolism and potential products, *Water Research*, Jan. 2011, vol. 45, no. 1, p.11-36.

PIENKOS, P.T. DARZINS, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Bio refining*, vol. 3, n° 4, 2009, p.431-440.

PITTMAN, J.K., DEAN, A.P., OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, Jan. 2011

, vol. 102, no. 1, p.17-25.

PRUVOST, J., VAN VOOREN, G., COGNE, G., LEGRAND, J. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*, December 2009, vol. 100, no. 23, p.5988-5995.

## Q

QUINN, J.C. and DAVIS, R. "The potentials and challenges of algae based bio fuels: A review of the techno-economic, life cycle, and resource assessment modeling," *Bioresource Technology*, May 2015, vol. 184, p. 444-452.

## R

RATTI, C. *Advances in food dehydration*. CRC Press, United States: 2009, p.488.

RAWAT, I., RANJITH KUMAR, R., MUTANDA, T., BUX F. Dual role of microalgae: Phytoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88, 2011, p.3411–3424.

RICHMOND, A., BECKER, E.W. Technological aspects of mass cultivation, a general outline. *CRC handbook of microalgal mass culture*, 1986, p.199-243.

RICHMOND, A. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, 2004, p.1-588.

RICHMOND, A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Hydrobiologia* 512: 2004, p.33-37.

RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons, 2008.

## S

SATYANARAYANA, K. G., MARIANO, A. B. and VARGAS, J. V. C. "A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials," *international journal of energy research*, Mars, 2011, vol. 35, n°. 4, p. 291-311.

SHAFIEE, S. and TOPAL, E. "When will fossil fuel reserves be diminished? " : *Energy Policy*, 2009, vol. 37, n°. 1, p. 181-189.

SOTTIEZ, P. *Produits Dérivés Des Fabrications Fromagères: Lait Et Produits Laitiers ; Vache, Brebis, Chèvre*, Ed Lavoisier. Paris : 1990, 633p.

SOTTIEZ, P. Produits dérivés des fabrications fromagères. Laites et produits laitiers : vache, brebis, chevre/Societe scientifique d'hygiene alimentaire. Francois M.Luquet, coordonnateur, assiste d'Yvette Bonjean-Linczowski. prefaces de J. Keilling,R. de Wilde.1985.

SISO, M.I. The biotechnological utilization of cheese whey: areview. Bioresource Technology, 1996, p. 1-11.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E. ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering 101: 2006, p.87-96.

SRIVASTAVA, A. et PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2000, volume 4, numéro 2, p. 111-133.

STANSELL, G.R., GRAY, V.M., et SYM, S.D. Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. Journal of Applied Phycology, 2012, volume 24, numéro 4, p. 791-801.

## T

Tetra Pack Processing System, Manuel de transformation du lait, Suede : 1995, 442 p.

TUSON, S.K. Biodiesel handling and use guidelines.[en ligne]. 2001. [Consulté le 20 mai 2019]. p. 1-22. Disponible sur : <<http://www.angelfire.com/ks3/go/diesel/files042803/biodieselhandling.pdf>>

## U

UDUMAN, N., QI, Y., DANQUA, M.K., HOADLEY, A.F.A. Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement. *Chemical Engineering Journal*162: 2010,p 935–940.

## V

VANANUVAT, J. ET KINSELLA, J. Production of Yeast Protein from Crude Lactose by *Saccharomyces fragilis* Batch Cultures Studies', Journal of Food Science, 1975, Vol 40, p. 330-341.

VIEITEZ, C. JACHMANIN, F., CARDOZO, L., OLIVEIR.J.V. Non-Catalytic Production of Ethyl Esters Using Supercritical Ethanol in Continuous Mode. In Biodiesel – Feed stocks, Production and Applications, Z. Fang, Edition In Tech, 2012.

## W

Wageningen University (2009). Heterotrophic organisms, [En ligne]. Disponible sur

[http://www.algae.wur.nl/UK/technologies/production/heterotrophic\\_organisms/](http://www.algae.wur.nl/UK/technologies/production/heterotrophic_organisms/)

(Page consultée le 17 mai 2019).

## X

XIONG, W., LI, X., XIANG, J. WU, Q. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 78, n° 1, 2008, p.29-36.

XU, H., MIAO, X. WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, vol. 126, n° 4, 2006, p.499-507.

## Y

YIN SHEN, Z.P. "Effect to nitrogen and extraction method on algae lipid yield," *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. 2009, vol. 2, n° 1, p. 51-57.

## Z

ZADOW, J. G. Fermentation of whey and permeate. *Bulletin of the IDF* N° 233, 5.1989. p.53-60

ZHU, M., ZHOU, P.P., YU, L.J. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technology*, août 2002 vol. 84, no. 1, p.93- 95.

## WEBOGRAPHIE

- **Site web [1]**  
<http://perspective.usherbrooke.ca/bilan/servlet/BMTendanceStatPays?langue=fr&codePays=DZA&codeStat=RSA.FAO.CheeseAllKinds&codeStat2=x>
- **Site web [2]** <https://www.statista.com/statistics/281134/number-of-vehicles-in-use-worldwide/>
- **Site web [3]** <https://www.arlafoodsingredients.com/about/press-centre/2015/pressrelease/acid-whey-is-a-big-dipper-thanks-to-new-protein-solution-1183949/>

Tous les sites sont consultés le 15 avril 2019.