

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A.MIRA-BEJAIA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne



Réf :

Mémoire de fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

Master

Thème :

**Valorisation des déchets par
voies biologiques**

Présenté par :

YACEF Liliane et BECHROUNE Maya

Soutenu le 27-06-2023

Devant le jury composé de :

Nom et prénom :

Grade :

Mme DJINNI Ibtissem

MCA

Présidente

Mme KERAMANE Badria

MCB

Examinatrice

Mme AZZOUZ Zahra

MAB

Promotrice

Mr AKSAS Ali

Professeur

Co-promoteur

Année universitaire : 2022/2023

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à

Mes parents,

***Mes sœurs, plus particulièrement Kahina pour sa sagesse, son
empathie et son humour.***

Mes neveux et nièces, plus particulièrement Silva et Sayan.

A toute la famille Bechroune.

***À Liliane Yacef qui a été un repère cette dernière année, sa joie
de vivre, son humour, sa persévérance, son travail acharné ont
été d'une aide inestimable.***

À la famille Yacef.

À tous les gens qui étaient de passage dans ma vie.

Maya

Cher papa, chère maman.

Je tiens à profiter de ce moment pour vous remercier d'avoir été là pour moi lorsque personne d'autre ne l'était, de m'avoir soutenu tout au long de mon parcours scolaire, votre amour inconditionnel et encouragement ont été

essentiels à ma réussite, merci d'avoir cru en moi !

Je dédie ce travail à mes deux petits frères Nadir et Yanni, qui m'ont souvent encouragée et soutenue, je vous aime très fort.

A mes grands-parents, ainsi que toute ma famille.

A mes copines d'enfance Selma et Célia et à ma cousine Sara.

A mon binôme MAYA, je n'oublierai jamais les moments passés avec toi durant ces cinq derniers mois, merci d'avoir été aussi sympa, attentive et surtout persévérante.

A la famille Bechroune.

A ma meilleure rencontre Massilia, merci d'avoir été à mes côtés durant tous les hauts et les bas.

Aux personnes que j'aime ...

A tous mes camarades de la promo M2 BM.

Liliane

Remerciements

Nous remercions tout d'abord le bon Dieu, de nous avoir donné la patience et la santé afin de finir ce travail.

Nos remerciements s'adressent à Mr. **KECHA M**, professeur à l'université de Bejaia, directeur du laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), de nous avoir accueillies au sein du laboratoire.

Nous remercions également Madame **DJINNI I**, maître de conférences classe A à l'université de Bejaia, de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury, ainsi que Madame **KERAMANE B**, maître de conférences classe B à l'université de Bejaia, pour le précieux temps qu'elle a bien voulu consacrer à lire et à juger ce travail en tant qu'examinatrice.

Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude à notre promotrice et co-promoteur, Madame **AZZOUZ Z**, et Monsieur **AKSAS A**, pour la qualité de leur accueil, leur disponibilité, leur professionnalisme, leur bienveillance, leur soutien constant, leur patience et la confiance qu'ils nous ont accordée. Leur rigueur scientifique, leur écriture pédagogique et leurs prodigieux conseils nous ont été d'une grande utilité durant ce travail.

Nous exprimons toute notre reconnaissance aux doctorants et étudiants du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), pour leur aide, leur sympathie et l'agréable ambiance de travail qu'ils ont fournie. Ainsi qu'à **Nassima** l'ingénieure du laboratoire pour ses précieux conseils et son soutien tout au long de la réalisation de notre pratique.

En dernier, nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de notre travail.

Liste des figures

Figure 01 : Accumulation des déchets ménagers et assimilés dans la ville de Bejaia	6
Figure 02 : Structure et la composition de la biomasse lignocellulosique	8
Figure 03 : Structure de la lignine.....	8
Figure 04 : Structure de l'hémicellulose	9
Figure 05 : Représentation schématique de la structure chimique de la cellulose.....	10
Figure 06 : Représentation schématique de la biodégradation de la cellulose.....	11
Figure 07 : Fibres cellulosiques dans la pâte du papier	13
Figure 08 : Préparation du substrat de fermentation	17
Figure 09 : Cultures de la fermentation solide.....	17
Figure 10 : Les étapes de récupération d'extraits enzymatiques.....	18
Figure 11 : Activités endo et exoglucanases avec la méthode de DNS	19
Figure 12 : Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	20
Figure 13 : Filtration de l'extrait enzymatique, précipitation et récupération des protéines après centrifugation.....	21
Figure 14 : Concentration et stérilisation de l'extrait enzymatique	22
Figure 15 : Saccharification de carton dans un fermenteur 3L.....	23
Figure 16 : Suspension de la souche <i>S.cerevisiae</i> et repiquage dans un milieu gélosé	24
Figure 17 : Cultures de production de Bioéthanol	25
Figure 18 : Distillation du produit avec rotavapor	25
Figure 19 : Pycnomètre et balance de précision.....	26
Figure 20 : Aspect macroscopique de la souche et solution sporale.....	27
Figure 21 : Cultures de fermentation après 7 jours d'incubation.....	28
Figure 22 : Histogramme comparatif des activités des activités endo-exoglucanases et β -Glucosidase des deux types de carton.....	29
Figure 23 : Histogramme montrant les résultats des activités cellulolytiques avant et après concentration.	31
Figure 24 : Histogramme montrant le taux du glucose produit lors de la saccharification du carton.	32
Figure 25 : Aspect de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
Figure 26 : Croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dans les différents milieux.....	34
Figure 27 : Produit récupéré dans le ballon après distillation.....	36
Figure 28 : Valeurs de densité des échantillons testés et leur teneur en éthanol.....	37

Figure 01 : Courbe d'étalonnage de glucose à 2g/L	Annexe I
Figure 02 : Courbe d'étalonnage des protéines.....	Annexe II

Liste des tableaux

Tableau I : Évolution des quantités de déchets ménagers et assimilés produits dans la ville de Bejaia	6
Tableau I : Composition du milieu Mandels et Weber	Annexe I
Tableau II : Préparation du tampon citrate de sodium.	Annexe I
Tableau III : Composition du réactif de DNS.....	Annexe I
Tableau VI : Composition du milieu YEPD	Annexe I
Tableau V : Composition du milieu d'enrichissement	Annexe I
Tableau I : Table de concentration de la mixture eau - éthanol à différentes températures	Annexe III

Liste des abréviations

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomique o

AND : Agence nationale des déchets

BG : *Aspergillus niger* strain BG

CET : Centres d'enfouissement techniques

CMC : Carboxymethyl cellulose

DMA : Déchets ménagers et assimilés

DNS : 3,5-acide dinitrosalicylique.

H : Hydrolysats

HE : Hydrolysats Enrichi

Kg/J : Kilogramme par jour

LMA : Laboratoire de Microbiologie Appliquée.

OM : Ordures Ménagères

PDA : Potato Dextrose Agar

pH : Potentiel d'Hydrogène

pNP-G : p-nitrophényl-β-D-glucoopyranoside.

Rpm : Revolution per minute

SSF : Solide state fermentation

Ton/J : Tonne par jour

Tr/min : Tour par minute

YEPD : Yeast extract peptone dextrose

ρ : Masse volumique

Sommaire

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les déchets.....	4
1.1. Définition du terme « déchet ».....	4
1.2. Classification des déchets.	4
1.3. Statistiques sur la production de déchets en Algérie.....	6
1.4. Impact des déchets sur l'environnement.	7
2. Valorisation de la biomasse lignocellulosique.....	7
2.1. Lignine.	8
2.2. Hémicellulose.	9
2.3. Cellulose	9
2.4. Les voies de valorisation.	12
3. Production de Bioéthanol par saccharification et la bioconversion du carton.	13

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Matériel.....	15
II. Méthodes.....	15
1. Production d'enzymes cellulolytiques par fermentation solide à base de carton.	15
1.1. Caractérisation macroscopique de la souche <i>Aspergillus niger</i> strain BG.	16
1.2. Remise en culture et préparation de la solution sporale.....	16
1.3. Préparation de substrat de fermentation.	16
1.4. Fermentation solide.....	17
1.5. Récupération des extraits enzymatiques.	18
1.6. Mesure des activités enzymatiques.....	18
1.7. Dosage des protéines.	20
2. Saccharification du carton et production de bioéthanol.	21
2.1. Saccharification du carton.	21
2.2. Production de Bioéthanol.	23

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Caractérisation macroscopique de la souche <i>Aspergillus niger</i> strain BG et préparation de la solution sporale.....	27
2. Production d'enzymes cellulolytiques par fermentation solide du carton.	27
3. Saccharification de la biomasse cellulolytique.....	30
4. Production de Bioéthanol par fermentation.....	33
5. Distillation du produit fermenté.....	36
6. Analyse des produits obtenus par détermination de la densité.....	37
CONCLUSION.....	39

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

***Introduction
Générale***

Ces dernières années, la protection de l'environnement est devenue une préoccupation majeure pour toute la société. En effet, le développement démographique et économique de notre pays génère une production massive de déchets de différentes natures tels que les résidus alimentaires, agricoles, textiles, plastiques et électroniques. Leur élimination préoccupe la plupart des citoyens à cause des risques qu'ils comportent pour la population, ainsi que pour l'environnement et notre économie.

Les pays développés ont exploité différentes solutions, notamment la valorisation, afin de tirer profit de cette situation désavantageuse. L'Algérie, en tant que pays en voie de développement, a montré qu'en 2018, 1% seulement des déchets étaient compostés, tandis qu'environ 7% étaient recyclés et 82% éliminés (**Bouadam, 2022**).

Selon l'agence nationale de déchets (AND), il a été constaté que 11,1 millions de tonnes de déchets ont été produits en 2021, dont seule une petite partie est recyclée, quant au reste, il est soit enfoui dans des CET (Centres d'enfouissement techniques), soit abandonné dans la nature, ce qui entraîne des coûts économiques et des effets néfastes sur l'environnement (**AND, 2022**).

Les répercussions de la pollution, de l'épuisement des matières premières et des ressources naturelles et de l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre ont conduit à une prise de conscience de la nécessité de trouver une solution alternative dans le cadre du développement durable, la valorisation se présente comme une alternative visant à réduire la pollution en exploitant les déchets comme source de bioénergie (**Corkal et al., 2020**).

Les bioénergies représentent un enjeu majeur pour réduire l'impact des énergies fossiles sur l'environnement et accroître l'indépendance énergétique. Les biocarburants sont produits par des procédés biologiques ou thermiques au cours desquels la biomasse est convertie en carburants liquides (éthanol, lipides comme précurseurs) ou gazeux (isobutène ou hydrogène), la valorisation des coproduits permettra de contribuer à la viabilité économique et environnementale de la filière lignocellulosique pour la production de biocarburants (**Alfenore et al., 2016**).

Durant la dernière décennie, trois générations de biocarburants se sont succédé, en fonction de la nature de la ressource exploitée, ceux de première génération sont obtenus à partir du saccharose et de l'amidon ou des lipides des plantes oléagineuses concurrentes des usages

alimentaires, ceux de deuxième génération sont issus des ressources lignocellulosiques et la troisième génération est issue de la conversion du CO₂ par des bactéries et des algues photosynthétiques (**Mussatto et al., 2010 ; Alfenore et al., 2016**).

Les déchets solides tels que le papier sont considérés comme une source d'énergie renouvelable présentant un grand potentiel d'utilisation en tant que matière première dans la production énergétique. Il est devenu un grave problème d'élimination dans les pays développés et en développement en raison de la diminution de la capacité des décharges. En tant que matière première cellulosique, le papier semble être une option attrayante pour la production de bioéthanol en raison des coûts inférieurs de la matière première, du potentiel plus élevé de remplacement des combustibles fossiles et de la réduction des émissions de gaz à effet de serre par rapport à la production d'éthanol (**Byadgi et Kalburgi, 2016 ; Ruan et al., 2020**).

La conversion de la biomasse lignocellulosique par fermentation microbienne en vue de la production de bioéthanol est considérée comme une solution attrayante pour le remplacement de la production à base de pétrole et ce, d'une manière économique et durable. En raison de sa facilité d'utilisation des systèmes et outils de biologie synthétique, *Saccharomyces cerevisiae* est devenue une robuste plateforme microbienne largement utilisée dans la production de biocarburants (**Oh et Jin, 2020**).

A ce titre, la biomasse lignocellulosique fut naturellement au centre des recherches pour la production des carburants de substitutions et même pour étudier de nouvelles filières de biotechnologie blanche (bio raffineries), les voies métaboliques extrêmement diversifiées trouvées chez les champignons peuvent aboutir à la synthèse de nombreuses molécules utilisables d'un point de vue commercial et industriel comme l'éthanol, les acides organiques, différentes enzymes, et des antibiotiques (**Roussos et Raimbault, 1982**).

Ce travail s'inscrit dans la tendance actuelle d'exploiter les déchets de l'industrie papetière pour produire des enzymes cellulolytiques à un coût compétitif permettant de produire des biocarburants de 2^{ème} génération.

- Le 1er chapitre de ce document fournit un aperçu bibliographique des différents types de déchets, leur classification, leur impact sur l'environnement et leur traitement par différentes méthodes de valorisation.

- Le 2ème chapitre présente la partie expérimentale, y compris l'équipement et les techniques utilisés pour la préparation du substrat ainsi que des souches fongiques, la production d'enzymes cellulolytiques, saccharification du substrat et la fermentation de l'hydrolysate de saccharification dans le but de produire du bioéthanol.
- Le 3ème chapitre porte sur les résultats et la discussion des résultats obtenus au cours de cette étude.

Chapitre I
Synthèse Bibliographique

1. Généralités sur les déchets

1.1. Définition du terme « déchet »

D'après la loi N° 01-19 du 12 décembre 2001, un déchet est défini comme : tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation, et plus généralement toute substance, ou produit et tout bien meuble dont le propriétaire ou le détenteur se défait, projette de se défaire, ou dont il a l'obligation de se défaire ou d'éliminer (JORA, 2001).

1.2. Classification des déchets

1.2.1. Selon leur nature physique

La classification des déchets selon leur nature aboutit à quatre catégories essentielles (Murat, 1981) :

- **Déchets solides** : ordures ménagères, déchets de métaux, caoutchouc, plastique, bois, papeterie.
- **Boues** : boues de station d'épuration des eaux urbaines ou industrielle, boues d'origines diverses (de surface, d'hydrocarbures, de peinture).
- **Déchets liquides** : huiles usagées, solutions résiduaire diverses, etc.
- **Déchets gazeux** : les gaz à effet de serre (dioxyde de carbone et de soufre).

1.2.2. Selon leur origine

- **Déchets industriels** : Les déchets industriels sont des déchets créés par des activités industrielles, telles que les usines, les moulins et les mines, et peuvent être classés en deux catégories : les déchets provenant d'activités industrielles qui ne posent pas de menace sur la santé publique ou l'environnement, et les déchets issus d'activités industrielles qui peuvent être nuisibles à la santé publique ou à l'environnement (Millati et al., 2019 ; Vignesh et al., 2021).
- **Déchets urbains** : Déchets ménagers, tels que les déchets de plastique et de papier, les boîtes de conserve, les déchets de céramique et de verre (Noor et al., 2020).
- **Déchets agricoles** : Il s'agit de déchets générés par divers processus agricoles, tels que les déchets d'élevage provenant des fermes avicoles et des abattoirs, les déchets de l'industrie agroalimentaire et les déchets de récolte tels que la paille et le son de blé (Augier, 2008 ; Duodu et al., 2022).

1.2.3. Selon leur mode de traitement et d'élimination

Les déchets sont regroupés en quatre catégories principales en fonction de leur traitement et de leur méthode d'élimination ; ces déchets sont différents et peuvent comporter des fractions inorganiques, des fractions organiques, des fractions biodégradables et des substances non biodégradables.

- **Déchets inertes** : Sont des déchets qui ne subissent aucune modification physique, chimique ou biologique lors de leur enfouissement. Issus notamment de l'exploitation minière, de la construction et de la démolition, ces déchets ne sont pas contaminés par des substances dangereuses ou d'autres éléments nuisibles susceptibles de nuire à la santé ou à l'environnement (terre, gravats, sable, etc.) (**Hou, 2016**).
- **Déchets banals** : Sont des déchets non dangereux, essentiellement constitués de papier, de plastique, de carton et de bois, produits par des secteurs industriels et commerciaux, et des déchets ménagers (**Messai et Ghenouchi, 2015**).
- **Déchets spéciaux** : Selon l'article 03 de la loi 01-19 du 12 décembre 2001, les déchets spéciaux sont des déchets issus des activités industrielles, des laboratoires de recherches universitaires et hospitaliers, de services et toutes autres activités qui, en raison de leur nature et de la composition des matières qu'ils contiennent ne peuvent être collectés, transportés et traités dans les mêmes conditions que les déchets inertes, ménagers et assimilés (**JORA, 2001**).
- **Déchets dangereux** : Ce sont des déchets qui, par leurs constituants ou les caractéristiques des substances nocives qu'ils contiennent, risquent de nuire à la santé publique ou à l'environnement (**Hamzaoui, 2011**).
- **Les déchets inorganiques** : Il s'agit de déchets provenant de matières qui ne peuvent pas être décomposées, comme le plastique, les boîtes de conserve et les bouteilles en verre. Ces déchets peuvent être recyclés en produits nouveaux et utiles, comme les bouteilles en plastique et les bouteilles usagées (**Sutarti et al., 2019 ; Puspitasari et al., 2022**).
- **Les déchets organiques** : Les déchets organiques comprennent les résidus alimentaires biodégradables provenant de l'industrie alimentaire, les déchets ménagers et les boues d'épuration. Les plantes, les animaux et les activités industrielles produisent une énorme quantité de déchets organiques, dont une grande partie reste inutilisée, comme les déchets végétaux, animaux et industriels (**Chatterjee et al., 2017 ; Singh et al., 2019 ; Pandey et al., 2022**).

1.3. Statistiques sur la production de déchets en Algérie

Selon un responsable du département de l'environnement et du développement durable au ministère, chaque année, le tissu industriel algérien génère plus de 325 000 tonnes de déchets de toutes sortes. Celui-ci précise que près de 50 % de ces quantités peut être valorisé au travers des unités industrielles elles-mêmes (AND, 2022).

Tableau I : Évolution des quantités de déchets ménagers et assimilés produits dans la ville de Bejaia (Aid et Bouadam, 2021)

Année	2012	2013	2014	2015	2019
Ration Kg/j	0,76	0,77	0,79	0,8	0,84
Ton/j	151,1	155,4	160,4	164,9	190

Dans la ville de Bejaia, la quantité de déchets produits par jour est estimée à 190 tonnes, tandis que la production moyenne de déchets par personne atteint 0,84 % par jour. La ville possède des qualités naturelles importantes, mais le secteur de l'environnement se trouve dans un état critique en raison de l'insuffisance de la collection des déchets ménagers et assimilés (DMA) (Aid et Bouadam, 2021).



Figure 01 : Accumulation des déchets ménagers et assimilés dans la ville de Bejaia (Slimani, 2022).

1.4. Impact des déchets sur l'environnement

La décomposition des déchets ne prend pas toujours la même durée, ce qui peut aller de quelques jours à des milliers d'années, à titre d'exemple : **(Siedmto, 2020)**

- Les déchets végétaux : de quelques jours à quelques mois
- Mouchoirs et serviettes en papier : 3 mois
- Papier journal et carton : de 3 à 12 mois
- Bouteilles en plastique : de 100 à 1000 ans
- Cannette en aluminium : de 200 à 500 ans
- Verre : 4000 ans

Les stratégies de gestion des déchets inadéquates peuvent émettre des gaz à effet de serre et des produits chimiques toxiques qui sont libérés dans l'atmosphère, le sol et les voies d'eau. Ces dernières années, la gestion des déchets en Algérie a constitué une priorité pour le ministère de l'Environnement. Pour cela, une série de textes et d'organismes ont été adoptés **(Djemaci, 2012)**.

En 2022, les données indiquent un taux de valorisation de 10 % du volume total des déchets produits annuellement, alors que le ministère vise à porter ce taux à 30 % d'ici à 2035 **(Anonyme (a), 2023)**.

2. Valorisation de la biomasse lignocellulosique

La biomasse désigne la fraction biodégradable des produits, déchets et résidus agricoles, ainsi que des déchets industriels, la biomasse lignocellulosique est une ressource végétale abondante et renouvelable, un substrat complexe composé principalement de polysaccharides (cellulose et hémicelluloses) et d'un polymère non glucidique qui est la lignine (Figure 02) **(Alfenore et al., 2016 ; Zoghlami et al., 2019)**. Les trois constituants représentent 40 à 50 % de la cellulose, 25 % de l'hémicellulose et 25 à 35 % de la lignine, dont les proportions sont variables selon les plantes étudiées **(Poursat, 2015)**.

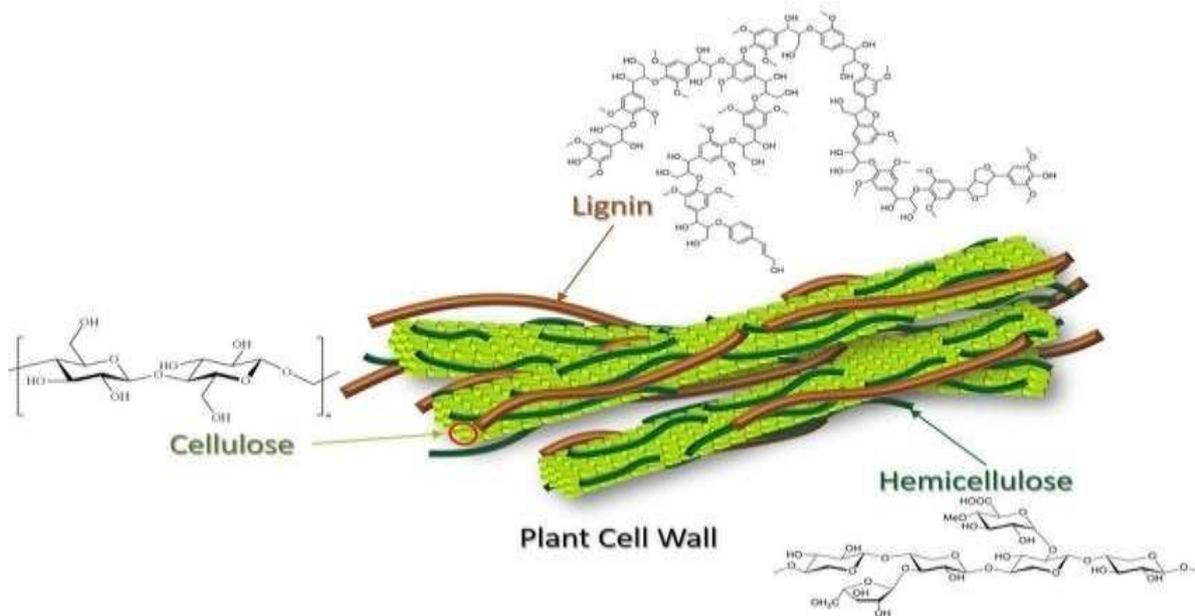


Figure 02 : Structure et la composition de la biomasse lignocellulosique (Jensen et al.,2017)

2.1.Lignine

La lignine est un polymère alkyl-aromatique présent dans les parois cellulaires des plantes terrestres. La lignine fournit la structure et la rigidité aux plantes, elle se lie aux fibres de cellulose (Figure 03) pour durcir et renforcer les parois cellulaires végétales et constitue une barrière naturelle très efficace contre les attaques microbiennes tout en permettant le transport de l'eau et des nutriments à travers les tissus végétaux (Foyle et al., 2007 ; Funnel-Harris et al., 2010 ; Katahira et al., 2018)

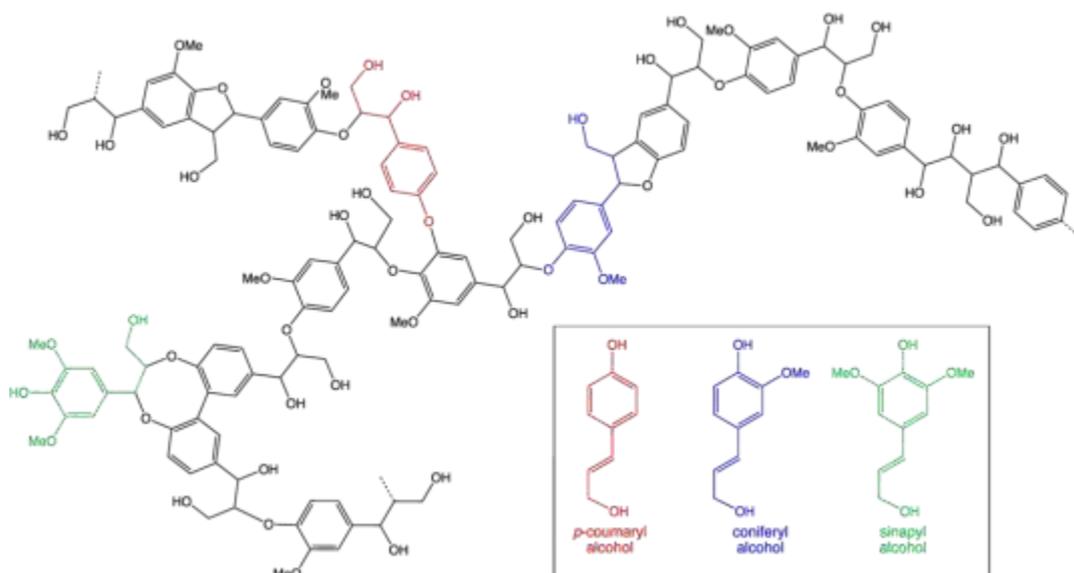


Figure 03 : Structure de la lignine (Garedew, 2021)

2.2. Hémicellulose

L'hémicellulose est connue comme le deuxième matériau glucidique le plus abondant, elle représente un groupe de polysaccharides de la paroi cellulaire (Alam et al., 2014 ; Ahmad et Zakaria, 2019). L'hémicellulose est une famille de composés hétéro-poly-saccharidiques composés de sucres de type pentose (principalement arabinose et xylose) et/ou des sucres de type hexose (glucose, mannose et galactose). La structure chimique de la fraction hémicellulosique varie d'une espèce à l'autre. Néanmoins, dans la biomasse lignocellulosique, la majorité des hémicelluloses appartiennent aux familles des xylanes, des mannanes et des galactanes (Benhamou, 2015).

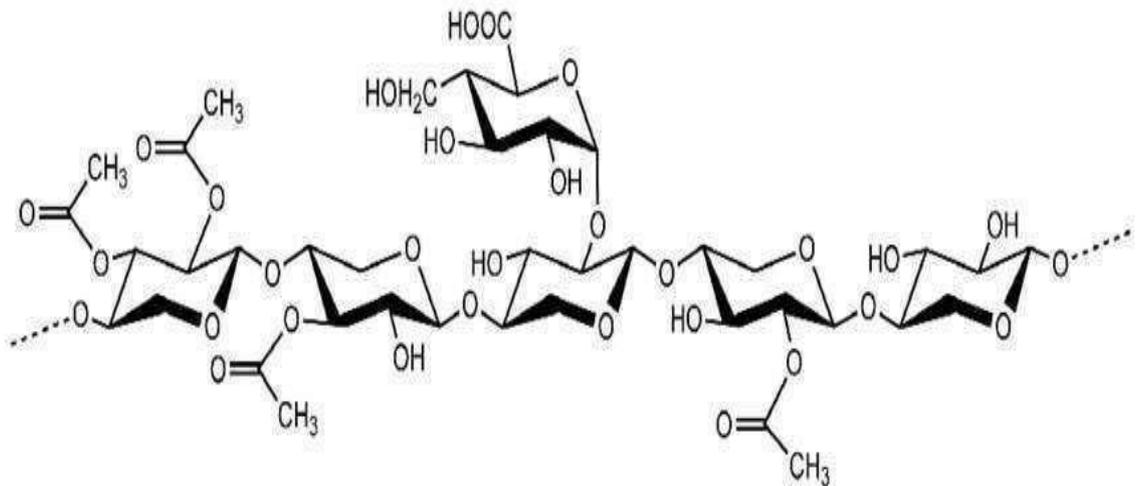


Figure 04 : Structure de l'hémicellulose (Hu et al, 2020)

2.3. Cellulose

La cellulose est la matière organique la plus abondante sur Terre, sa disponibilité dans la nature approche le trillion de tonnes, elle représente une matière première industrielle de premier ordre. Sous forme brute ; les fibres de cellulose sont utilisées pour la production de pâte à papier ainsi que les différents matériaux plastiques (Denis, 2021).

La cellulose (C₆ H₁₀ O₅)_n, qui est un polysaccharide formé de molécules de glucose, représente un composant structurel important de la paroi cellulaire primaire des plantes vertes, d'algues et d'oomycètes (Kumar Gupta et al.,2019).

C'est un homopolymère linéaire d'unités anhydro D-glucose liées entre elles par des liaisons β-1,4 glucosidiques. La liaison hydrogène entre les molécules de cellulose entraîne la

formation de régions cristallines hautement ordonnées qui ne sont pas facilement accessibles à l'eau (Foyle et al., 2007).

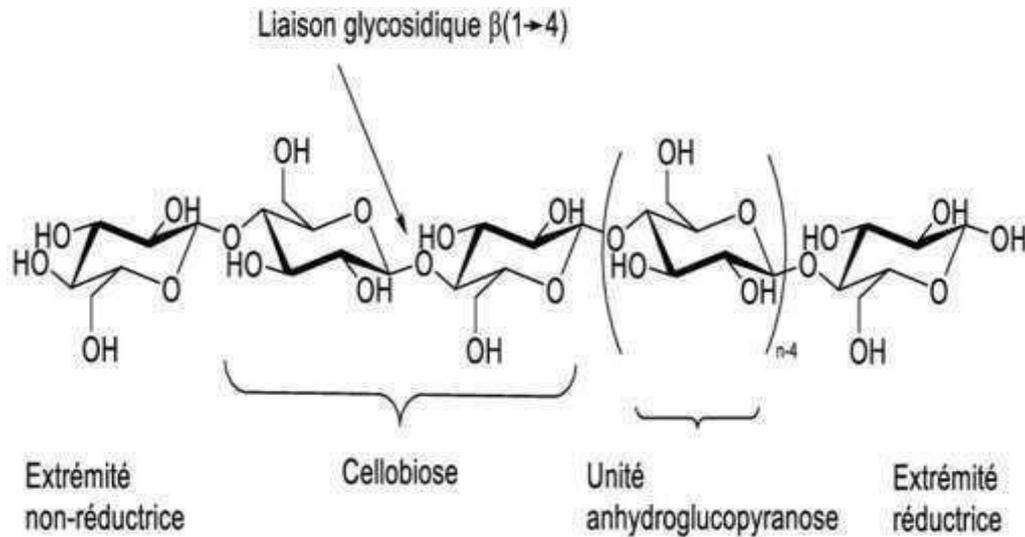


Figure 05 : Représentation schématique de la structure chimique de la cellulose (Imbert, 2017)

2.3.1. Biodégradation de la cellulose

La dégradation de la cellulose, dont la bioconversion en sucres solubles et en glucose se fait par l'intermédiaire d'un groupe d'enzymes appelées cellulases, constitue un système multienzymatique composé de trois enzymes qui sont : l'enzyme β-D-1,4-Endoglucanase, β-D-1,4Exoglucanase et β-D-glucosidase (Watanabe et Tokuda, 2010)

- **Endoglucanases :** Les endoglucanases, également connues sous le nom de (CMC ases), présentent une affinité pour les régions amorphes de la cellulose et favorisent de manière aléatoire les liaisons β-glycosidiques internes, ce qui libère des oligomères de différentes longueurs, tels que le cellobiose et les cello-oligosaccharides. Lorsque les endoglucanases agissent sur les cellodextrines, la vitesse d'hydrolyse augmente en fonction du degré de polymérisation (Soccol et al., 2010 ; Kuhad et al., 2011 ; Zbed et al., 2017).

- **Exoglucanases :** Les exoglucanases sont des enzymes présentant une affinité vis-à-vis de la cellulose cristalline, agissant sur les polymères de cellulose à leurs extrémités non réductrices et libérant des résidus de cellobiose, en revanche, l'exoglucanase seule n'est active ni sur la cellulose cristalline, ni sur les celluloses solubles. Cependant, elle s'attaque aux celluloses partiellement dégradées. Cette enzyme a pour rôle essentiel de permettre l'action de l'endoglucanase sur la cellulose cristalline (Scriban, 1993).

- **β -glucosidase** : Il s'agit du principal agent enzymatique présent dans la cellulase, qui complète l'étape finale de l'hydrolyse de la cellulose (Figure 06) en convertissant le cellobiose en glucose (Singhania et al., 2013).

La dégradation de la cellulose par ces enzymes est un processus complexe, néanmoins, il permet de résoudre de nombreux problèmes, tels que la pollution de l'environnement ainsi que des problèmes énergétiques (par la production d'énergie : alcool, méthane) (Barbosa, 2020).

De nombreux microorganismes sont capables d'utiliser la cellulose comme seule source de carbone et d'énergie tout en produisant en parallèle l'enzyme cellulase. Parmi ces microorganismes, les champignons présentent un grand intérêt pour la production de ces enzymes, ils occupent une place importante dans le marché des cellulases car ils les sécrètent de manière extracellulaire et le taux de production est plus élevé par rapport aux autres microorganismes. Le plus souvent, les champignons cellulolytiques étudiés comprennent *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium* et *Aspergillus* (Hasper et al., 2002 ; Rana et Kaur, 2012).

Parmi ces champignons, le producteur principal est l'espèce *Aspergillus niger*, ce champignon filamenteux a été utilisé par les industries en raison de son efficacité pour la dégradation des polysaccharides des parois cellulaires végétales, en produisant des mélanges d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (Zhang et al., 2017).

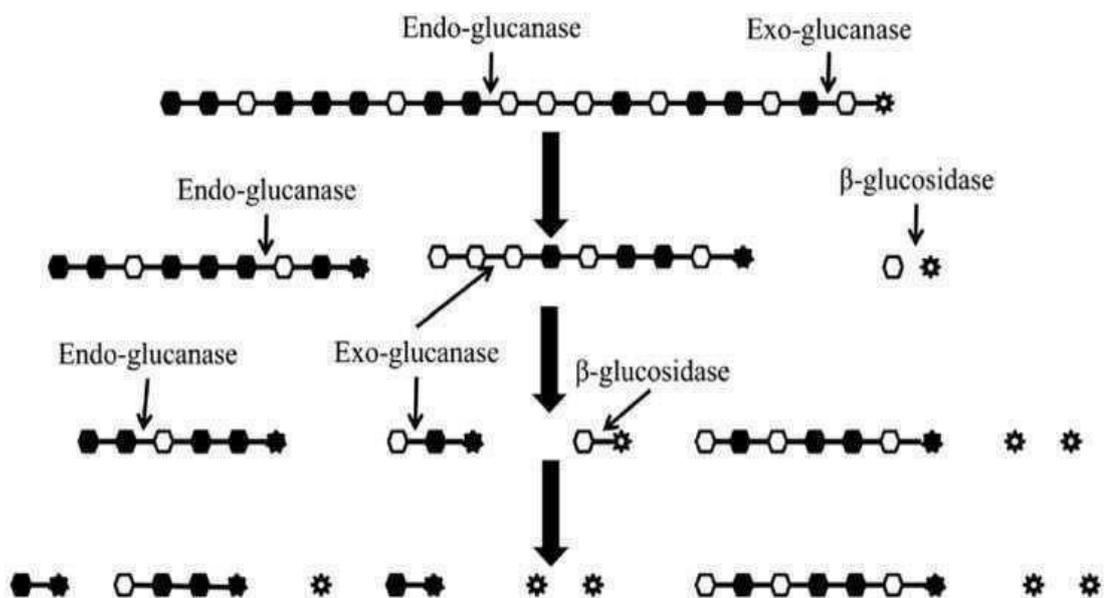


Figure 06 : Représentation schématique de la biodégradation de la cellulose (Saini et al., 2015)

2.4. Les voies de valorisation

La notion de valorisation des déchets fait référence à toute activité de transformation induite par l'industrie visant à réutiliser, recycler, composter les déchets et la biomasse pour les convertir en énergie, combustible ou en d'autres matériaux utiles (**Nzihou, 2010 ; Kabongo, 2013**).

La valorisation matière est définie comme l'utilisation de déchets en tant que produits de substitution à d'autres matières ou substances. Toutefois, la valorisation matière exclut toute forme de récupération d'énergie et de transformation en matières destinées à être utilisées comme combustibles. Cette valorisation englobe plusieurs opérations, telles que le réemploi, le recyclage, la réutilisation et la régénération (**Betrouni, 2018 ; Lachat, 2022**).

La valorisation énergétique consiste à produire de la chaleur, de l'électricité ou du carburant à partir de l'énergie produite durant le traitement thermique des déchets (**Rocher, 2008**). La production de cette énergie se fait par plusieurs méthodes, dont l'incinération et la gazéification. L'incinération consiste en une oxydation et minéralisation complète de la matière organique, en portant cette dernière à haute température en présence d'oxygène. Ce processus consiste à détruire les déchets en les brûlant, la chaleur dégagée sert à produire de la vapeur sous pression qui sera ensuite détendue dans un turbo-alternateur dans le but de produire de l'électricité (**Baloul, 2008 ; Lebon, 2019**). Quant à la gazéification, elle est considérée comme un procédé complexe qui regroupe plusieurs processus de transformation, qui habituellement, mène à la production maximale de gaz « combustibles ». Ainsi, le plus souvent, la gazéification consiste à produire des gaz à partir du résidu carboné issu de la pyrolyse (**Kple, 2015**), cette dernière consiste à chauffer les déchets à des températures généralement comprises entre 350 et 650 °C en absence d'oxygène, (ou en présence d'une très faible quantité d'oxygène ou d'air, destinée à apporter, par combustion très partielle, l'énergie nécessaire au processus de pyrolyse) (**ADEME, 2019**).

Dans la plupart des cas, la valorisation biologique (organique) consiste à utiliser des micro-organismes sous des conditions physico-chimiques contrôlées, dans le but de les induire à accomplir certaines réactions ou processus souhaités. L'objectif de ces traitements est de transformer des matières fermentescibles en produits plus fiables pouvant être utilisés comme amendements organiques ou comme supports de culture (**Bayard et Gourdon, 2022**). Parmi les méthodes de valorisation par voie biologique, on trouve la saccharification, qui est un processus par lequel les polymères de cellulose et d'hémicellulose sont hydrolysés en sucres

réducteurs fermentescibles. Elle est généralement réalisée à travers des systèmes enzymatiques (Singh et Chaudhary, 2017).

3. Production de Bioéthanol par saccharification et la bioconversion du carton

Le papier est une matière fabriquée à partir de fibres cellulosiques végétales, animales ou recyclées. Il est issu de la fibre de cellulose qui provient pour 85% du recyclage des emballages et pour 15% de fibres vierges (Haoues, 2009).

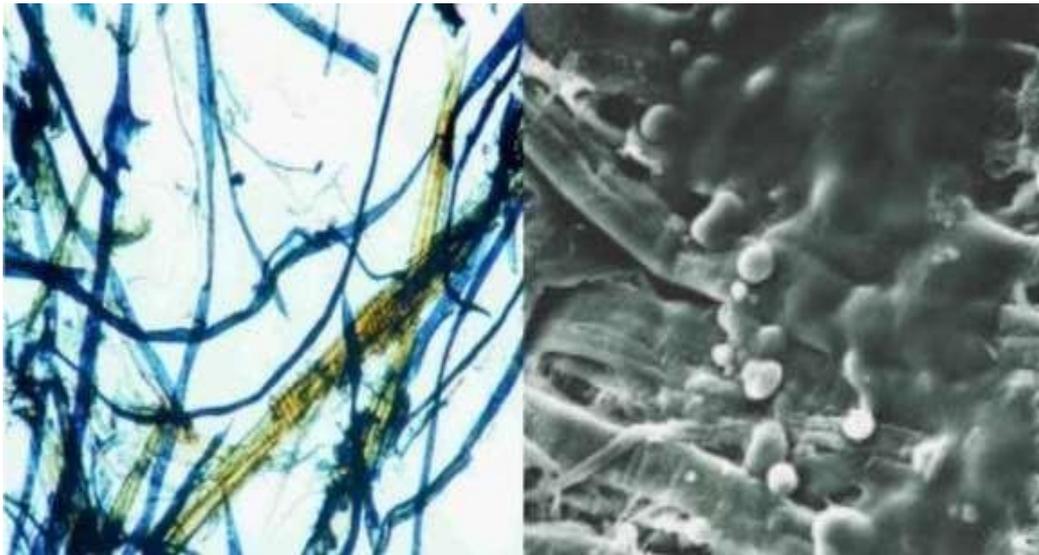


Figure 07 : Fibres cellulosiques dans la pâte du papier (Haoues, 2009)

Le carton, qui est un papier plus rigide et épais, peut être converti en produits énergétiques, tels que l'éthanol, le méthane et l'hydrogène, par la fermentation de microorganismes. Un bon processus de fermentation nécessite non seulement un microorganisme efficace, mais aussi des conditions et un équipement optimaux pour exercer un potentiel de production suffisant. Les procédés de fermentation de l'éthanol utilisant le carton comme matière première sont très différents de ceux de l'amidon et du sucre (Chen et al., 2008 ; Sun et al., 2010). Le carton doit être hydrolysé et fermenté après prétraitement pour obtenir de l'éthanol et d'autres produits biosourcés. Le premier processus est l'hydrolyse, puis la fermentation est utilisée, ce qui est appelé saccharification et fermentation séparées.

Lors de la saccharification industrielle, les sucres fermentescibles sont libérés du carton au cours d'un processus en deux étapes. La première étape consiste à utiliser des prétraitements physiques et/ou chimiques pour rendre les polysaccharides plus accessibles à l'hydrolyse

enzymatique. La deuxième étape consiste à traiter la cellulose exposée avec des cocktails d'enzymes cellulolytiques commerciaux, généralement produits à partir de champignons filamenteux tels que *Trichoderma reesei*, et *Aspergillus niger* qui dégradent ensuite la cellulose en sucres simples (Navarro et al. 2010 ; Khellil, 2017).

Selon Petterson, au moins trois enzymes (l'endo- β -1,4-glucanase, l'exo- β -1,4-glucanase et la β -1,4-glucosidase) seraient impliquées dans ce processus. Dans un premier temps, l'endoglucanase attaquerait la cellulose microcristalline dans les régions amorphes, créant des failles dans les chaînes linéaires. Cette action serait suivie par l'action en ces points de rupture de l'exoglucanase ou cellobiohydrolase, qui libère du cellobiose. L'action continue et combinée de ces deux enzymes (endo- et exoglucanase) entraîne la conversion complète de la cellulose en cellobiose et petits oligosides. La β -glucosidase ou cellobiase agit enfin sur le cellobiose et les oligosides pour donner du glucose (Petterson, 1975).

À l'aide de levures (*Saccharomyces cerevisiae*), les sucres hydrolysés sont convertis en bioéthanol pendant le processus de fermentation. La distillation est ensuite utilisée pour produire un alcool sans indice d'octane élevé, également appelé éthanol déshydraté ou éthanol anhydre (Alio, 2020).

Chapitre II
Matériel et Méthodes

Ce chapitre présente la partie expérimentale de notre travail réalisée au laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) à l'Université de Bejaia durant la période du 13 février 2023 au 16 mai 2023. Elle décrit les différents appareillages, produits et méthodes utilisés durant les quatre mois qui ont permis la réalisation de ce travail.

I. Matériel

Dans le présent travail, nous avons utilisé divers produits biologiques et chimiques. Nous avons également eu recours à des appareils. Ces produits et appareils sont cités ci-dessous.

Matériel Analytique : Le matériel utilisé dans ce travail est présenté dans Annexes I .

Matériel Biologique (micro-organismes) : moisissure (*Aspergillus niger*), levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*).

Matériel végétal (organique) : biomasse lignocellulosique (carton et poudre de carton produits chez Général Emballage).

II. Méthodes

1. Production d'enzymes cellulolytiques par fermentation solide à base de carton

Dans cette étude, il est question d'utiliser des déchets issus de l'industrie papetière comme le carton, dans le but de les valoriser par la production d'enzymes cellulolytiques par fermentation solide avec une souche fongique, cette souche fongique appartient à la collection de Laboratoire de Microbiologie Appliquée "LMA" de l'université de Bejaia. L'isolat a été identifié sur la base des caractéristiques morphologiques combinées aux données de séquences de leurs régions intercalaires d'ADNr (Internal Transcribed Spacer, ITS), et a été identifié comme étant *Aspergillus niger* strain BG (Azzouz et al., 2020).

1.1. Caractérisation macroscopique de la souche *Aspergillus niger* strain BG

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères cultureux (identification macroscopique). L'analyse de ces caractères est étudiée après 07 jours d'incubation de la souche sur milieu PDA, l'identification des caractères cultureux se base essentiellement sur la vitesse de croissance, la texture et la couleur des colonies, la couleur du revers de la culture, le mode reproduction.

1.2. Remise en culture et préparation de la solution sporale

La remise en culture de la souche d'*Aspergillus niger* strain BG a été effectuée par inoculation d'une série de boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé PDA (Potato Dextrose Agar). Les boîtes sont ensuite incubées à 28 °C pendant une période de 7 jours.

Les suspensions de conidies ont été récoltées en inondant des boîtes de Pétri après la sporulation avec une solution d'eau Tween 80 à 0,1%, puis en grattant la surface avec une pipette stérile. Les spores ont été collectées dans des flacons stériles et ces suspensions ont ensuite été utilisées pour inoculer des cultures sur des milieux solides. Le comptage des spores a été effectué sous microscope optique sur cellule de Malassez (Marienfeld, Allemagne) (Handa et al., 2014 ; Ang et al., 2015). La charge de l'inoculum est exprimée en quantité de spores par millilitre de solution sporale.

1.3. Préparation de substrat de fermentation

Dans cette étude, deux types d'échantillons ont été utilisés comme source de carbone (carton et poudre de carton). Ces déchets de carton riches en matières organiques proviennent de l'industrie Général Emballage située à Akbou-Bejaia.

Les échantillons de carton ont été préalablement coupés en petits morceaux, puis traités, ainsi que la poudre de carton, avec de l'eau distillée (figure 08), suivis d'un séchage dans un four Pasteur (Heraeus, Allemagne) à 70°C pendant 24 à 48 heures, avant d'être stockés à la température ambiante (Azzouz et al., 2020).

Avant de lancer la fermentation, le taux d'humidité des deux types de substrat a été déterminé à l'aide d'un dessiccateur (MOC - 120 H Shimadzu, France).



Figure 08 : Préparation du substrat de fermentation : traitement de la poudre de carton (a) et carton (b)

1.4. Fermentation solide

Les cultures sont effectuées dans 08 Erlenmeyers de 500mL contenant 10g de substrat (04 Erlenms contenant 10g de carton et 04 Erlenms contenant 10g de la poudre de carton), humidifié à 70% avec la solution minérale Mandels et Weber (**Mandels et Weber, 1969**) dont le pH est de 5.

Les Erlenms sont fermés avec du coton cardé, suivis d'un traitement thermique (AdvantageLab, AL02-12) à 120 °C durant 20 minutes, après refroidissement, les Erlenms ont été inoculés avec la solution sporale de la souche *Aspergillus niger* strain BG à raison de 1.10^7 spores/g de substrat, puis ont été homogénéisés à l'aide d'une spatule stérile. Les cultures sont ensuite incubées dans une étuve (Nüve, EN 055) à 28°C durant 7 jours.



Figure 09 : Cultures de la fermentation solide

1.5. Récupération des extraits enzymatiques

A la fin de la fermentation, 100 mL d'eau distillée ont été ajoutés dans chaque Erlen contenant le substrat fermenté puis ont été homogénéisés afin de récupérer les complexes enzymatiques produits.

Les suspensions obtenues ont ensuite été filtrées puis centrifugées (Rotina 380R, Allemagne) à 10 000g pendant 15min à 4°C, les surnageants obtenus constituent les extraits enzymatiques bruts et sont conservés à 4°C.



Figure 10 : Les étapes de récupération d'extraits enzymatiques : cultures obtenues après fermentation (a), filtration (b) et extraits enzymatiques bruts (c)

1.6. Mesure des activités enzymatiques

Le papier est un produit fabriqué à partir de fibres en cellulose, dont 85 % de ces fibres proviennent d'emballages recyclés et 15 % de fibres vierges (Haoues, 2009). Les enzymes impliquées dans l'hydrolyse de la cellulose sont de trois types : l'endoglucanase, l'exoglucanase et la β -glucosidase.

a. Activité endoglucanase (CMCase)

L'activité endoglucanase (CMCase) a été mesurée selon la méthode décrite par Bailey (Bailey et al., 1992), 0,1 mL de complexe enzymatique sont ajoutés à 900 mL du tampon citrate de sodium (50 mM pH 5) contenant 2% de substrat carboxyméthyl cellulose (CMC, Sigma Aldrich, USA). Une cinétique d'hydrolyse de CMC a ensuite été réalisée à 50 °C durant 10 min. Le mélange réactionnel a été additionné de 1,5 mL de DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique), puis chauffé à 100°C pendant 5 minutes, suivi d'un refroidissement dans un bain d'eau glacée.

Afin de déterminer les sucres réducteurs libérés, l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (UVmini-1240 Shimadzu) à une longueur d'onde de 540 nm.

Afin de déterminer la concentration de glucose libéré, la courbe d'étalonnage est établie à partir des différentes concentrations de glucose obtenues à partir d'une solution mère de 2 g/L (Annexe II).

Une unité « CMCCase » est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une μM de sucres réducteurs, équivalent au glucose, par minute selon les conditions réactionnelles (Miller, 1959).

b. Activité exoglucanase (Avicelase)

Cette activité a été déterminée selon la méthode décrite dans la section a. avec quelques modifications, dont 0,1 mL d'extrait enzymatique produit par fermentation solide de carton ont été ajoutés à 900 mL de substrat contenant 2% d'avicel préparé dans du tampon citrate de sodium (50 mM pH 5). Une cinétique d'hydrolyse a ensuite été réalisée à 50°C durant 10 min, 1.5 mL de DNS ont été ajoutés au mélange réactionnel (figure 11), suivis d'un chauffage à 100°C durant 5 minutes, après refroidissement dans de l'eau froide, le mélange réactionnel a été centrifugé à 100 000 rpm pendant 10 min. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une λ de 540 nm.

La concentration de glucose libéré est déterminée par référence à la courbe d'étalonnage avec des concentrations variables en glucose allant de 0 jusqu'à 2g/L.

Une unité « Avicelase » a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une μmole de sucres réducteurs, équivalent au glucose par minute dans les conditions du test (Miller, 1959).



Figure 11 : Activités endo et exoglucanases avec la méthode de DNS

c. Calcul des activités mesurées par la méthode DNS

Les absorbances des échantillons sont converties en concentration de glucose libéré à partir de la courbe linéaire d'étalonnage (Annexe II).

Activité enzymatique = [(quantité de glucose libéré (mg) / masse molaire de sucre libéré (mg/ μ mol)) * volume du mélange réactionnel (mL)] / [volume de l'enzyme (mL) * temps d'incubation (min)]

Activité enzymatique = (mg de glucose libéré / 0.18016 mg/ μ mol) / (0.1 ml * 10 min) = μ mol $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ = U/ml

d. Dosage de l'activité β -glucosidase

La libération de p-nitrophénol ($\epsilon_{410}=15,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a été mesurée par spectrophotométrie à 410nm. Le mélange réactionnel est composé de 100 μ l de tampon citrate de sodium (50 Mm pH 5) contenant 3,5mM (0.2%) de P-nitrophényl- β -D-glucopyranoside (pNPG) et de 100 μ l de la dilution appropriée à l'extrait brut de culture. Les essais sont incubés à 50°C pendant 10 min et les réactions sont arrêtées par l'addition de 500 μ l de 2% Na_2CO_3 .

Une unité d'activité β - glucosidase a été définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse une μ mol de pNPG par minute respectivement.

1.7. Dosage des protéines

Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford en utilisant le réactif BioRad et l'albumine de sérum bovin comme standard (**Bradford, 1976**), 200 μ L de la solution Bradford ont été ajoutés à 800 μ L d'extrait enzymatique (figure 12), les solutions sont incubées à l'obscurité pendant 5 à 15 min. L'absorbance est ensuite mesurée à 595nm.

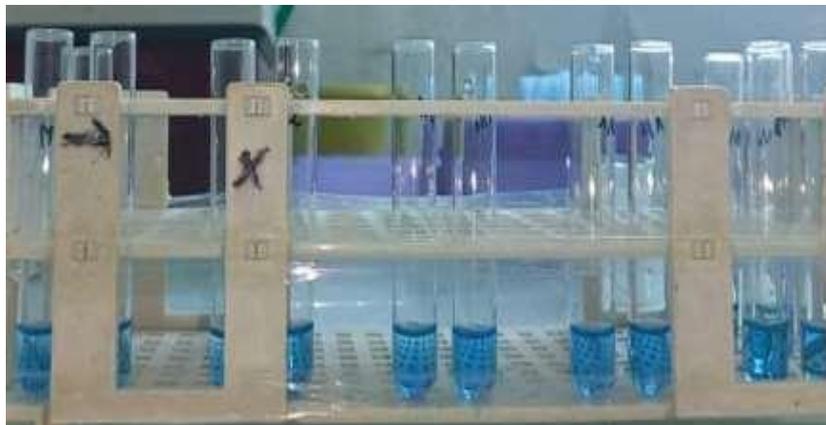


Figure 12 : Dosage des protéines par la méthode de Bradford

2. Saccharification du carton et production de bioéthanol

Le carton qui est de nature cellulosique peut être converti en sucres fermentescibles par l'action synergique d'enzymes comprenant des exo- et endoglucanases et des β -glucosidases (Guo et al., 2018), les actions synergiques entre ces enzymes sont nécessaires pour la dégradation de cellulose et sont essentielles pour libérer du glucose.

Dans ce contexte, les endo-exo-glucanases, et β -glucosidases produites par la souche *A. niger* strain BG ont été étudiées pour leurs capacités à saccharifier la cellulose de déchets de carton qui est une ressource renouvelable abondante dans la biosphère. C'est le principal composant de ce déchet, qui peut être hydrolysé en glucose pour être ensuite transformé en bioéthanol.

2.1. Saccharification du carton

2.1.1. Concentration et stérilisation de l'extrait enzymatique brut

Avant la réalisation de la saccharification, l'extrait enzymatique a été filtré avec du papier Whatman N°1, puis soumis à une précipitation des protéines avec du sulfate d'ammonium de concentration qui varie de 20%, 40%, 60% et 80%, l'incubation est effectuée over night sous agitation afin d'atteindre les degrés de saturation.

Ensuite, le mélange a été centrifugé à 6000 tr/mn pendant 10 min, le surnageant est éliminé et les protéines sont suspendues dans l'eau distillée après le rejet de surnageant.

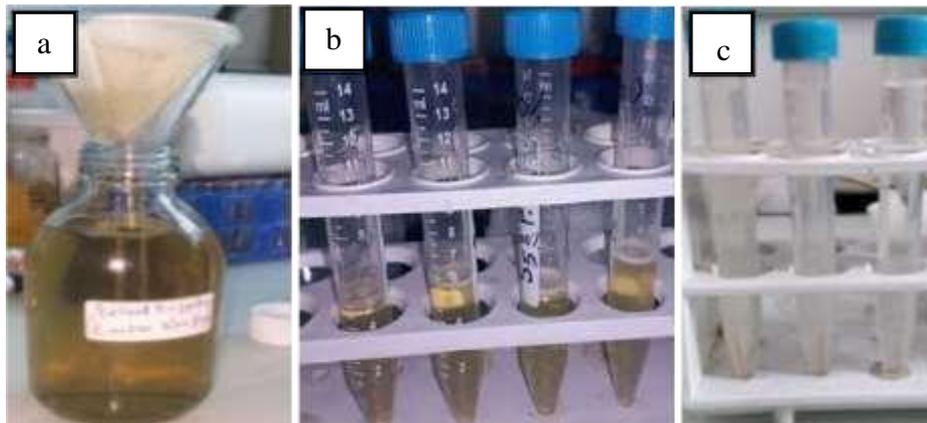


Figure 13 : Filtration de l'extrait enzymatique (a), précipitation des protéines (b) et récupération des protéines après centrifugation (c)

La suspension protéique obtenue est ensuite concentrée et dialysée dans un tampon de citrate de sodium par ultrafiltration à l'aide de centrifugeuses Amicon Ultra-15 avec un seuil de 3 kDa (Merck-Millipore). Ce procédé, basé sur le phénomène de diffusion à travers une membrane semi-perméable, permet d'éliminer les ions ou les petites macromolécules d'une solution macromoléculaire, tout en conservant les protéines en raison de leur poids moléculaire élevé (**Fellous, 1977**). L'échantillon concentré a été filtré séquentiellement à l'aide des filtres à seringue de 0,45 et 0,22 μ M (Merck-Millipore).

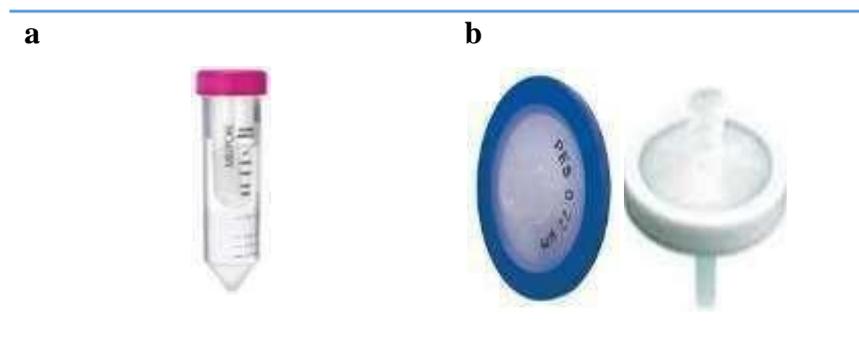


Figure 14 : Concentration de l'extrait enzymatique par ultrafiltration à l'aide d'Amicon Ultra15 (3 kDa) (a) et stérilisation par filtration à l'aide des filtres à seringues (b)

2.1.2. Hydrolyse totale du carton

L'hydrolyse totale de la cellulose nécessite l'intervention de trois enzymes, telles que l'endo- β -1,4-glucanase, l'exo- β -1,4-glucanase et la β -1,4-glucosidase qui agissent en synergie pour dégrader le complexe cellulolytique en sucres réducteurs (**Eloutassi et al, 2014**).

Le carton simple a été sélectionné afin d'effectuer l'étape d'hydrolyse, la capacité de la β -glucosidase à saccharifier ce carton a été évaluée par mesure du glucose libéré. L'extrait enzymatique concentré a été utilisé comme catalyseur. 20g de carton a été saccharifié dans un bioréacteur de 3L (Lambda Minifor) contenant 2 L de tampon citrate de sodium (50 mM, pH 5). Le bioréacteur est stérilisé à 120°C pendant 20 min. Après refroidissement, l'extrait enzymatique concentré est ajouté en raison de 1 U/mL de β -glucosidase. La saccharification a été effectuée à 40 °C sous agitation pendant 3h, 6h, 9h, 24h, 48h, et 72h.

Le glucose libéré a été mesuré à différents temps de réaction en utilisant la méthode de Miller (**Miller, 1959**). Un mélange réactionnel contenant 50 μL d'échantillon, 450 μL d'eau distillée et 750 μL de DNS est homogénéisé au vortex puis incubé à 100 °C pendant 5 min.

Après refroidissement dans un bain d'eau glacée, l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 540nm.



Figure 15 : Saccharification de carton dans un fermenteur 3L (Lambda Minifor)

2.2. Production de Bioéthanol

La fermentation alcoolique consiste à transformer les sucres fermentescibles en anaérobiose par des levures en alcool et gaz carbonique avec dégagement de calories selon la réaction suivante :



Après la saccharification du carton, l'hydrolysate est filtré et remis dans le fermenteur, préalablement stérilisé à 120°C pendant 20 minutes, dans le but de faire fermenter les sucres issus de l'hydrolyse du carton en présence de *Saccharomyces cerevisiae*, qui est la levure la plus couramment utilisée dans la production éthanolique à l'échelle industrielle (**Tesfaw, 2014**).

La souche *Saccharomyces cerevisiae* a été fournie par le Centre de Recherche Biologique Margarita Salas (CIB-CSIC, Madrid, Espagne). L'inoculum de cette souche est préparé en suspendant une quantité de cette souche lyophilisée dans de l'eau distillée stérile.

Après homogénéisation, cette suspension nous a permis de repiquer la souche sur des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA, celles-ci ont ensuite été incubées à 28°C pendant 24 à 72h (figure 16)

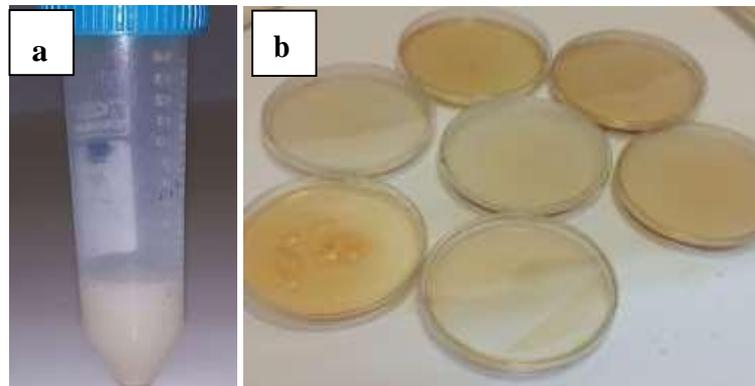


Figure 16 : Suspension de la souche *Saccharomyces cerevisiae* (a) et repiquage dans un milieu gélosé (b)

Afin de produire du bioéthanol, 3 milieux différents sont utilisés (figure 17) :

- Milieu hydrolysat sans traitement (H), issu de la saccharification de carton, il contient seulement les sucres fermentescibles et l'eau distillé.
- Milieu yeast extract peptone dextrose YEPD (Annexe I) contenant 10% de glucose contrôle (Milieu contrôle).
- Hydrolysat enrichi (HE), cet hydrolysat a été enrichi avec des solutions minérales telles que l'extrait de Malt, l'extrait de levure, $MgSO_4/H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g de KH_2PO_4 , $CaCl_2$ et $FeSO_4, 7H_2O$ (Djeddou et al., 2018). La fermentation dans les milieux contrôles est réalisée dans un Shaker.

Pour la fermentation alcoolique, le volume de l'inoculum doit être à 5% du volume total du bouillon de culture et la charge de levures doit être de 10^6 cellules/mL au début de la fermentation.

Pour ce faire, une préculture de la souche *Saccharomyces cerevisiae* est préparée après 18h d'incubation à 28°C. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, 5 colonies de *Saccharomyces cerevisiae* isolées sur PDA sont prélevées et inoculées dans 100 mL des milieux H, HE et YEPD. Au cours de la fermentation, la cinétique de croissance de la souche a été suivie et

mesurée à 610nm dont les prélèvements sont effectués après 3h, 6h, 9h, 24h, 48h, 72h, 96h et 120h de fermentation.



Figure 17 : Cultures de production de bioéthanol (H, HE et YEPD)

2.2.1. Distillation du produit obtenu

La distillation est une technique efficace pour séparer une substance constitutive, telle que l'éthanol, d'un mélange fluide miscible tel qu'un bouillon de fermentation par évaporation et condensation sélectives. Selon le principe de la distillation, l'éthanol est séparé d'un mélange sur la base d'une différence de leurs volatilités (Yang et al., 2017).



Figure 18 : Distillation du produit avec rotavapor

2.2.2. Caractérisation de Bioéthanol

a. Détermination de la densité

La densité est une propriété intensive caractéristique d'une substance. Ainsi, des mesures de densité peuvent servir à identifier une substance pure inconnue s'il existe une liste des densités de référence possible. La densité d'un liquide est le rapport entre sa masse volumique et celle de l'eau. Pour la réalisation de cette étape, on utilise un pycnomètre (Marienfeld, Allemagne), qui est un petit flacon de forme conique, que l'on remplit avec le liquide étudié pour le peser à l'aide d'une balance analytique (RADWAG, AS 220/C/2).

La densité d'un liquide est donnée par le rapport : $d = \rho / \rho_{\text{eau}}$ La masse volumique $\rho = m / V$

Dans ce travail, on a d'abord réalisé une première mesure afin de déterminer le volume du pycnomètre. On a pesé le pycnomètre vide, puis le pycnomètre rempli d'eau distillée, Ensuite pour la détermination de la masse de notre échantillon, on a effectué une deuxième mesure où on a pesé une nouvelle fois le pycnomètre après l'avoir soigneusement rempli de notre échantillon.

La masse de l'échantillon = la masse du pycnomètre + échantillon - la masse du pycnomètre.

La masse volumique de l'échantillon a ensuite été mesurée.

Grâce à la masse volumique connue de l'eau et à la masse volumique de notre échantillon, on a pu calculer la densité de ce dernier : $D = \rho / \rho_{\text{eau}}$

Le protocole est refait pour les trois autres échantillons.

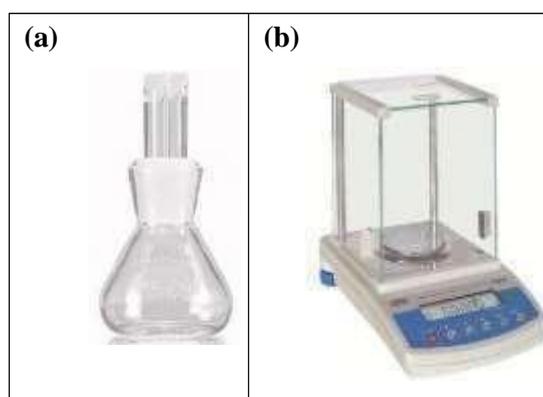


Figure 19 : Pycnomètre (a) et balance de précision (b)

Chapitre III
Résultats et Discussion

1. Caractérisation macroscopique de la souche *Aspergillus niger* strain BG et préparation de la solution sporale

Les caractères macroscopiques de la souche testée sont étudiés sur le milieu PDA après 07 jours, l'observation des caractères culturaux se base essentiellement sur la vitesse de croissance, la texture et la couleur des colonies (Makhlouf, 2019).

La croissance d'*Aspergillus niger* strain BG est rapide, les colonies sont granuleuses, blanches au début puis à maturité elles deviennent noires (Figure 20-a).

Les spores de la souche BG sont récupérées après 07 jours d'incubation sur milieu PDA, l'estimation de la charge sporale de la suspension fongique (Figure 20-b) est effectuée par un dénombrement des spores d'*Aspergillus niger* à l'aide d'une cellule Malassez sous microscope optique, la concentration de cette solution obtenue est de $4,5 \cdot 10^7$ spores/mL.



Figure 20 : Aspect macroscopique de la souche (a) et solution sporale (b)

2. Production d'enzymes cellulolytiques par fermentation solide du carton

Le processus d'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique nécessite la production d'enzymes lignocellulolytiques et la rentabilité de ce processus sur le plan économique. De nombreux travaux rapportent la production d'enzymes lignocellulolytiques à partir de matériaux

lignocellulosiques (Soni et al., 2010 ; Goldbeck et al., 2013 ; Bano et al., 2013 ; Azzouz et al., 2021). En raison de leurs fortes capacités de production et de sécrétion, les champignons les plus couramment utilisés dans l'industrie de fabrication d'enzymes appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Trichoderma* et *Penicillium*. A titre d'exemple, la souche *Trichoderma reesei* peut atteindre des rendements de production de cellulase de 40 g/L (Moore et al., 2011). La culture solide en erlen repose sur une distribution homogène des spores de mycètes à l'intérieur des substrats lignocellulosiques. La préparation d'un substrat poreux est nécessaire pour assurer une bonne aération et une croissance rapide du mycélium. Le pH acide et une charge importante de l'inoculum sporal favorisent cette croissance. L'humidité joue également un rôle important dans la croissance des mycètes et la production des enzymes dans les SSF (Brijwani, 2011).

La fermentation solide des substrats carton et poudre de carton avec la souche BG après 7 jours d'incubation à 28°C (Figure 21) nous a permis de sélectionner le substrat le plus performant.



Figure 21 : Cultures de fermentation après 7 jours d'incubation à 28 °C

Après centrifugation, les extraits enzymatiques des deux types de carton sont récupérés, puis les activités enzymatiques des endoglucanases (CMCases), des exoglucanases et β glucosidase sont mesurées. Les résultats obtenus sont illustrés dans la (Figure 22).

La (figure 22) présente les activités cellulosiques mesurées sur les deux substrats utilisés lors de la fermentation en milieu solide. En comparant les différentes activités des extraits enzymatiques bruts produits à 28°C, on remarque que le carton présente une meilleure activité d'endo-exo-glucanases et de β -glucosidase.

D'après les résultats obtenus, le substrat de carton produit la plus grande quantité de cellulases, c'est donc ce substrat qui est choisi afin de poursuivre notre travail.

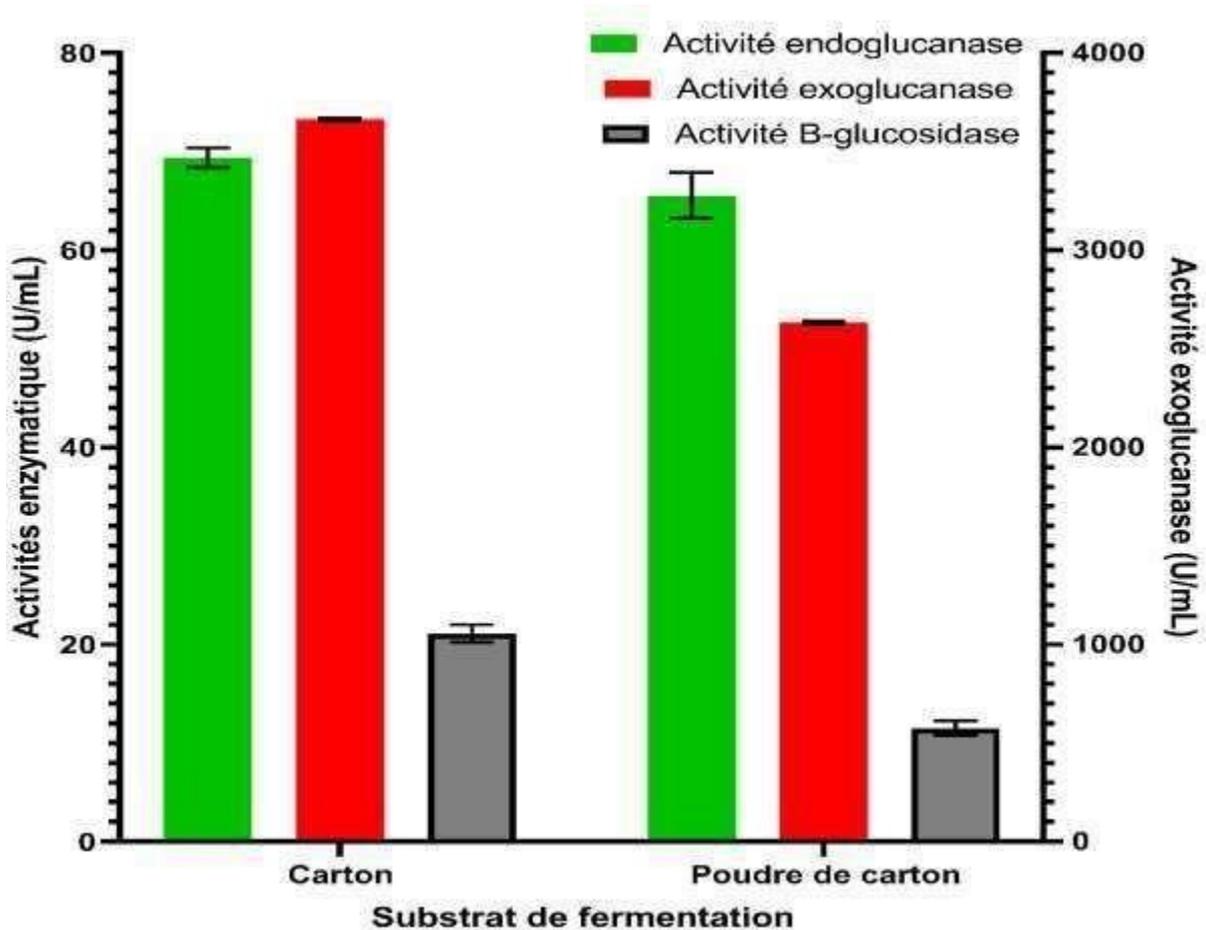


Figure 22 : Histogramme comparatif des activités endo-exoglucanases et β -Glucosidase des deux types de carton

Ces enzymes cellulases, sont produites par plusieurs microorganismes dont des bactéries, des actinomycètes et des champignons, mais ces derniers présentent un grand intérêt car ils excrètent leurs enzymes de manière extracellulaire. Parmi les différentes espèces de champignons productrices d'enzymes, on retrouve les souches d'*Aspergillus*, connues pour leur forte capacité de production (Bollok et Reczey, 2005 ; Bansal et al., 2012).

Jorgensen et al., (2004) ont montré que la composition des enzymes produites variait en fonction du substrat lignocellulosique sur lequel le micro-organisme se développe.

Juhasz et al., (2005), ont rapporté des niveaux plus élevés d'endoglucanase comparés à la β -glucosidase avec la souche *Trichoderma reesei* Rut C30 lorsqu'elle est cultivée sur des matériaux lignocellulosiques après sept jours. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec la souche d'*Aspergillus niger* strain BG.

Bansal et al., (2012) ont signalé que *A. niger* NS-2 présentait une large gamme de températures pour sa croissance et sa production de cellulase sur les résidus de déchets agricoles et de cuisine. De même, **El-Hadi et al., (2014)** ont signalé que la température optimale pour la production de CMCCase a été observée à 37 °C pour *Aspergillus hortai*.

Dar et al., (2013), ont montré que 75% de l'activité CMCCase est stable entre pH 4.0-7.0 avec une activité maximale à pH 5.6.

3. Saccharification de la biomasse cellulosique

L'hydrolyse enzymatique est l'opération unitaire du procédé de conversion de la lignocellulose qui utilise des enzymes pour dépolymériser la biomasse lignocellulosique. (**Modenbach et Nokes, 2013**)

Le carton est principalement composé de polysaccharides cellulosiques. Ce résidu de l'industrie papetière peut être converti en sucres fermentescibles par l'action synergique d'enzymes comprenant des exo- et endo glucanases et des β -glucosidases, ce processus appelé "saccharification" constitue une voie intéressante pour produire des biocarburants et des matériaux biologiques (**Guo,Chang, Lee 2018**).

Pour tester l'efficacité de la saccharification du carton à l'échelle du laboratoire, un protocole de saccharification a été établi. L'hydrolyse totale du carton est catalysée par des enzymes cellulases

Après ultrafiltration à l'aide d'un Amicon à seuil de 3 kDa, les activités enzymatiques de la CMCCase, de l'Avicelase et de la β -glucosidase après concentration sont respectivement égales à 284, 12932,94 et 37,21 U/mL (figure 23).

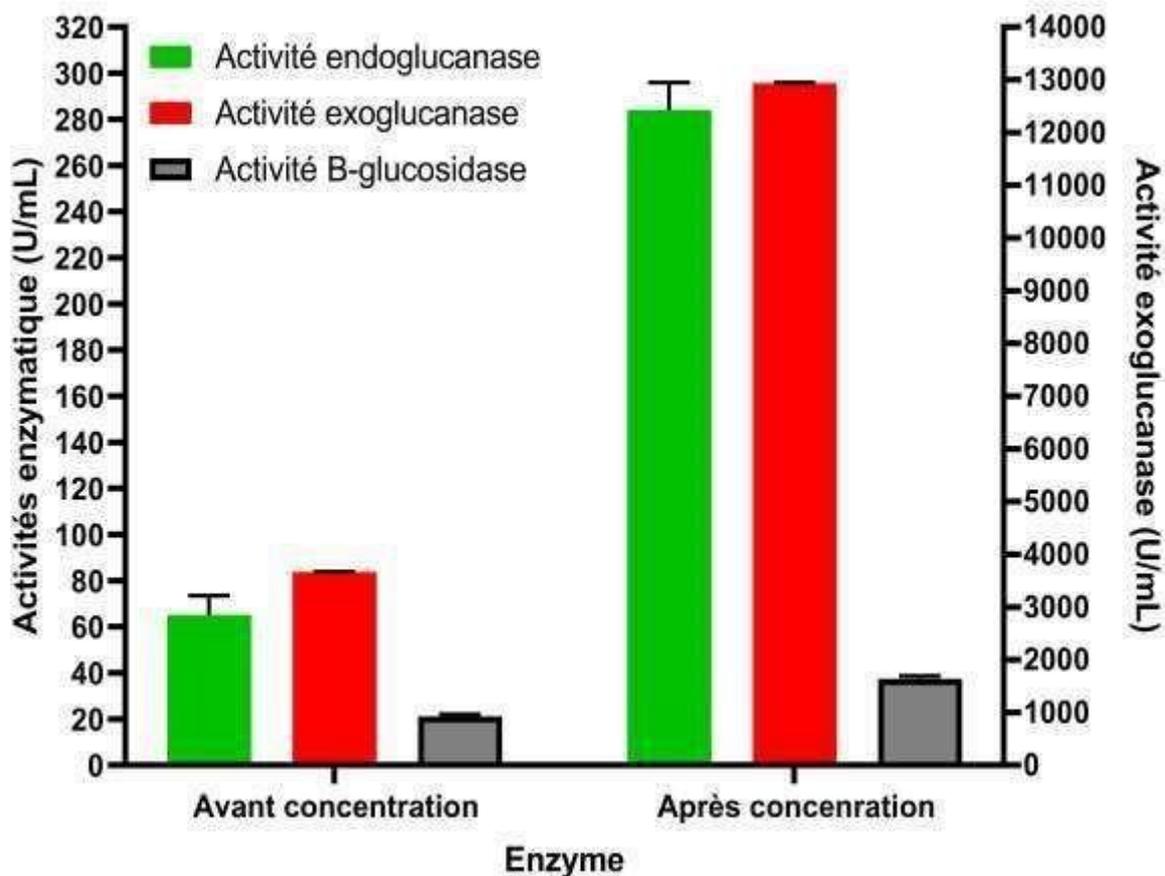


Figure 23 : Histogramme montrant les activités cellulolytiques avant et après concentration

On remarque, d'après les résultats illustrés dans la (figure 23), que l'activité enzymatique de l'extrait concentré a augmenté par rapport à l'extrait enzymatique non concentré.

Le complexe enzymatique produit par la fermentation solide du carton avec la souche d'*Aspergillus niger* a été examiné pour déterminer sa capacité de produire des monosaccharides en utilisant la cellulose du carton comme substrat d'hydrolyse.

La cinétique de l'enzyme est suivie durant cette saccharification, la (figure 24) représente le taux des sucres réducteurs mesurés après la saccharification de la biomasse cellulolytique (le carton) dans un temps allant de 3h à 168h. Les résultats illustrés dans la (figure 24) montrent que la cinétique d'hydrolyse du carton augmente progressivement jusqu'à 12 heures d'hydrolyse, puis la production de sucres réducteurs se stabilise à partir de 24 heures.

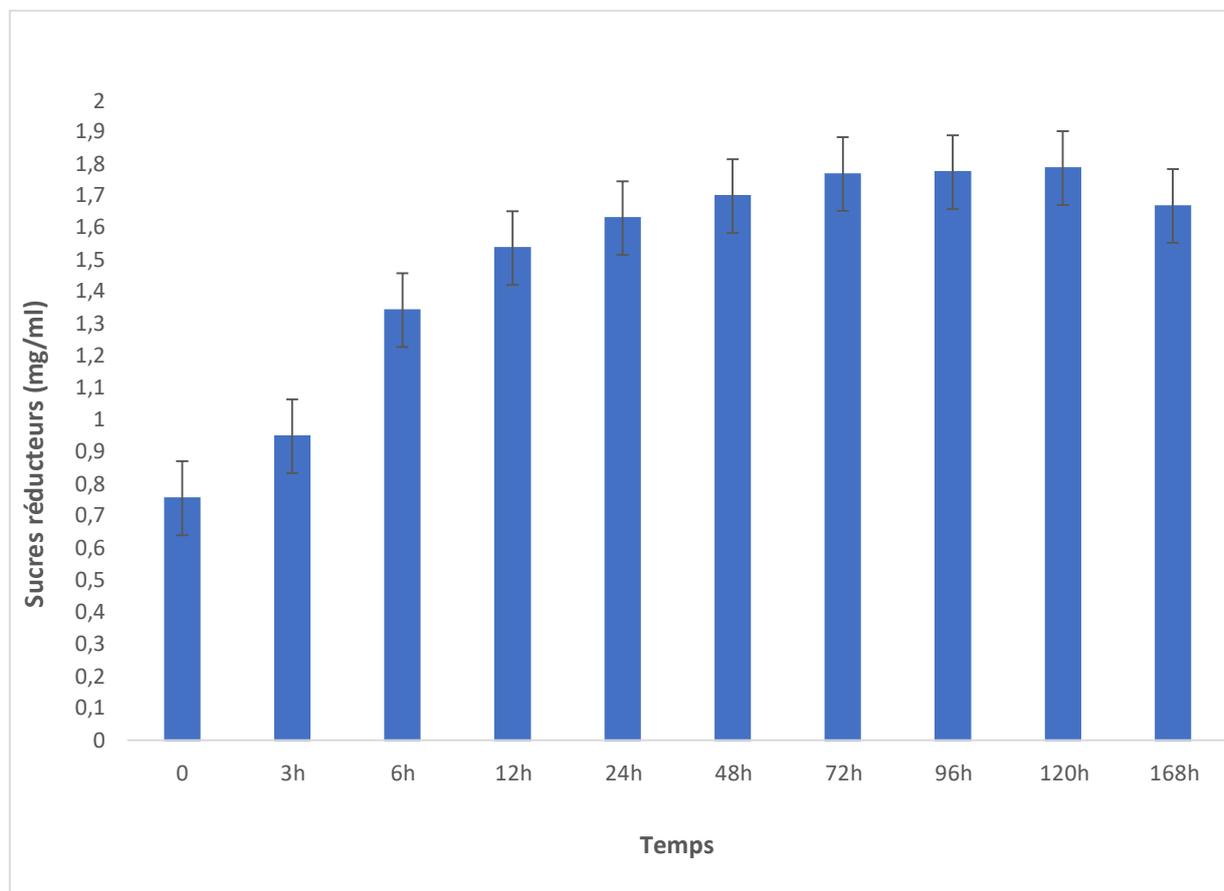


Figure 24 : Histogramme montrant le taux du glucose produit lors de la saccharification du carton

La cellulose est composée de chaînes de glucose liées par des liaisons β 1,4glucosidiques, qui sont difficiles à décomposer directement. Cependant, lors de la saccharification, des enzymes cellulolytiques appelées cellulases sont utilisées pour hydrolyser les liaisons β -1,4-glucosidiques de la cellulose en molécules de glucose individuelles. Dans des conditions idéales pour la dégradation, la cellulose microcristalline peut se dégrader rapidement, mais dans des conditions moins favorables, elle peut prendre beaucoup plus de temps pour se décomposer, ce qui permet de libérer le glucose.

Une fois le glucose libéré, il est utilisé par des levures ou des enzymes qui peuvent métaboliser le glucose pour produire de l'énergie par le biais de la fermentation (**Bornscheuer, 2014**).

Selon **Ciolacu et al., (2011)**, la stabilité du taux de glucose produit à partir de 12h se traduit par la digestion de la cellulose microcristalline caractérisée par la diminution de la taille des particules, dont la vitesse de dégradation dépend de divers facteurs tels que la température,

et d'autres conditions environnementales, ainsi l'analyse statistique a donné un p value inférieur à 0,05.

On peut noter aussi que la stabilité de production du glucose peut être influencée par les conditions réactionnelles, telles que le pH et la présence de catalyseurs spécifiques.

En conséquence, il a été démontré que l'utilisation de cocktails enzymatiques produits à partir d'une souche microbienne permet une meilleure dégradation de la biomasse par rapport aux préparations enzymatiques classiques (**Jorgensen et al., 2004**)

L'étendue et le degré de synergie des enzymes sont considérablement influencés par la nature du substrat cellulosique, y compris l'accessibilité globale à la cellulose, sa cristallinité, le degré de polymérisation, la nature des allomorphes de la cellulose et le type et la quantité/distribution de la lignine et de l'hémicellulose résiduelles (**Watson et al., 1991 ; Zhang et Cai, 2008**)

4. Production de Bioéthanol par fermentation

Tous les produits de saccharification ont été utilisés pour produire de l'éthanol par fermentation alcoolique en utilisant la levure de *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 25).

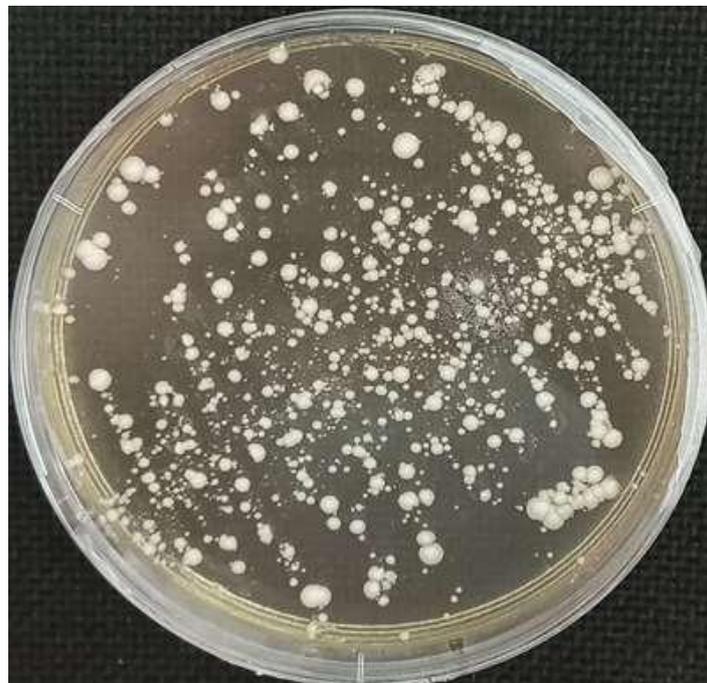


Figure 25 : Aspect *Saccharomyces cerevisiae*

Une série de fermentations ont été réalisées en utilisant différents milieux (H, HE, YEPD), avec deux milieux considérés comme contrôles (HE, YEPD). Une préculture de 18 heures de *Saccharomyces cerevisiae* (5 colonies de cette souche ont été placées dans 50 ml de milieu de culture de fermentation et incubées à 28°C/18h) a été introduite dans chacune des fermentations.

Au cours de ces fermentations, la cinétique de croissance des levures a été suivi par la mesure de l'absorbance à 610 nm, des prélèvements sont effectués après 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h et 120h dans chaque milieu (H, HE, et YEPD). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante :

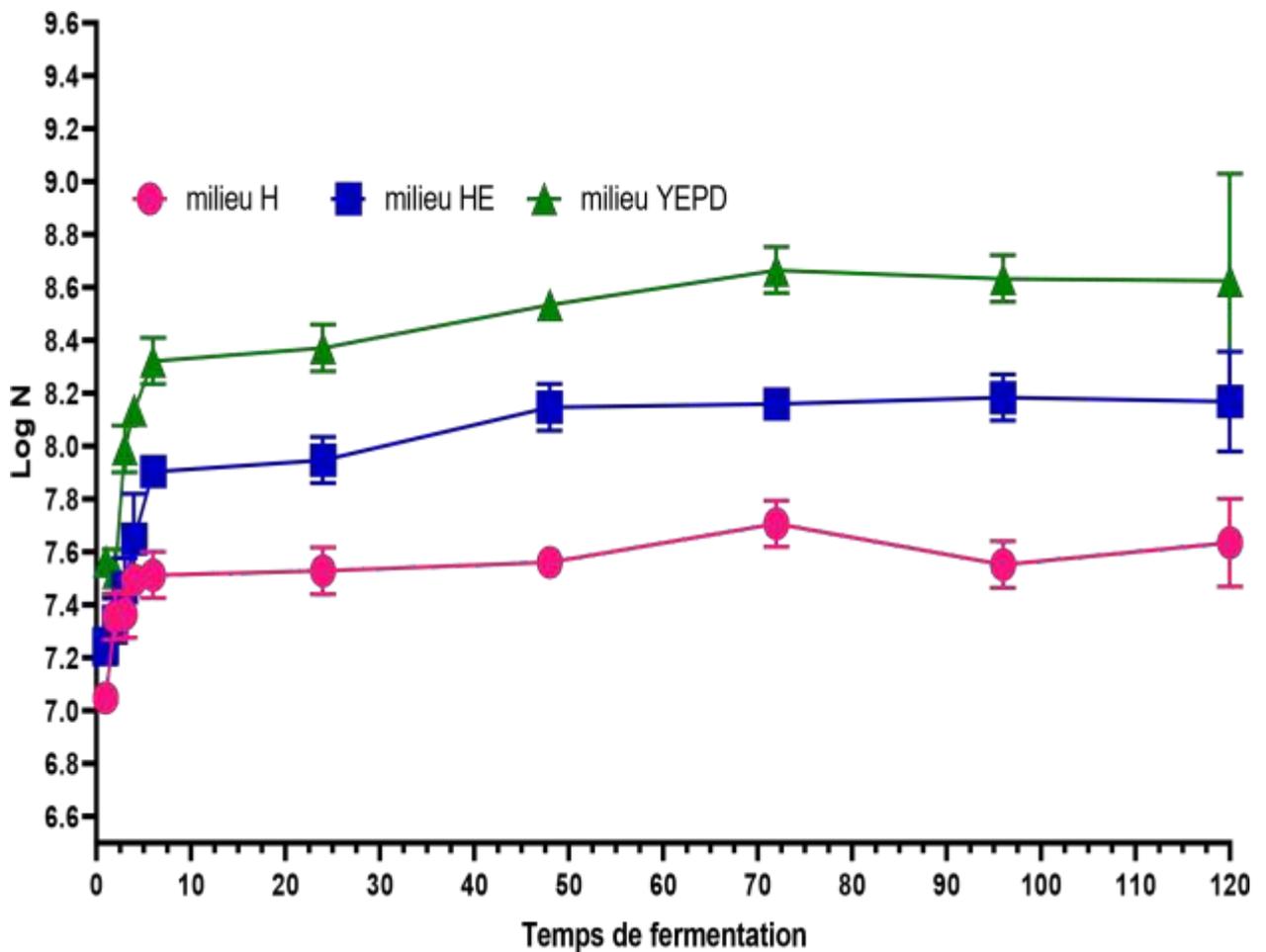


Figure 26 : Croissance de *Saccharomyces cerevisiae* dans les différents milieux (H, HE et YEPD)

On remarque d'après la (figure 26) que la croissance de la souche est relativement faible dans le milieu non enrichi (milieu H) comparée aux deux autres milieux (HE et YEPD).

Le milieu contenant l'hydrolysate enrichi (milieu HE) montre une croissance moyenne, légèrement plus élevée que celle du milieu non enrichi, tandis que le milieu YEPD révèle une croissance très élevée de la souche, qui est peut-être due à la forte concentration de glucose contenu dans le milieu.

Il existe certains facteurs inhibant qui peuvent affecter la croissance et l'activité métabolique de ces levures pendant la fermentation, parmi ces facteurs, on retrouve la température, des températures extrêmes, trop élevées ou trop basses, peuvent inhiber la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*. Chaque souche de levure a une plage de température optimale pour une fermentation efficace. La température adéquate pour une croissance optimale de *Saccharomyces cerevisiae* est entre 25° C et 30°C (**Morano, 2012**).

Saccharomyces cerevisiae se nourrit de glucose et d'autres sucres fermentescibles. La présence d'une source de carbone appropriée, telle que le glucose, le fructose ou le maltose, est essentielle pour sa croissance (**Turcotte et al., 2009**). Dans notre histogramme, on remarque que la croissance de notre souche est optimale dans le milieu YEPD, on peut justifier cette remarquable hausse par la quantité de glucose fournie à ce milieu qui a permis à *Saccharomyces cerevisiae* de croître rapidement.

En revanche, la faible croissance des levures dans l'hydrolysate non enrichi (H) peut être due au manque de nutriments et à la faible quantité de glucose disponible dans ce milieu.

La composition du milieu de fermentation affecte les performances de la levure. Le métabolisme du sucre par la levure est fortement influencé par la concentration des composants minéraux dans le milieu de croissance (**Birch et al., 2003**).

Plusieurs ions métalliques sont essentiels à la croissance et à la fermentation optimales des levures à des concentrations milli molaires, comme le magnésium, qui est impliqué dans de nombreuses fonctions essentielles à la physiologie de la levure, notamment : la division cellulaire et la croissance, à la structure et fonction mitochondriales, au métabolisme respiratoire-fermentatif et aux réponses au stress environnemental (**Birch et Walker, 2000**).

Dans le milieu (HE) enrichi par diverses sources minérales (le chlorure de calcium, le sulfate de magnésium, le phosphate mono potassique et le sulfate d'ammonium), la croissance est relativement élevée comparée au milieu H non enrichi. On confirme ici que la composition du milieu de fermentation affecte la croissance de la levure.

D'après Bisson (**Bisson, 1999**), il existe de nombreuses causes d'arrêt de fermentation connues. Dans la plupart des cas, l'arrêt est provoqué par l'apparition de facteurs de stress au cours de la fermentation. Ces facteurs de stress peuvent être d'ordre physiologique, comme par exemple la limitation nutritionnelle ou l'intolérance à l'éthanol, ou d'ordre environnemental, comme l'exposition à des températures extrêmes. Bien que les causes d'arrêts de fermentation soient connues en grande partie, déterminer la cause dans un cas spécifique peut s'avérer difficile.

5. Distillation du produit fermenté

Saccharomyces cerevisiae est une espèce de levures couramment utilisée dans les processus de fermentations, lorsqu'elle est exposée à une solution contenant du glucose, elle utilise des enzymes spécifiques lors du processus de glycolyse afin de décomposer le glucose présent dans les matières premières en pyruvate. Le pyruvate est ensuite converti en éthanol et en dioxyde de carbone (**Morano, 2012**).

Après 10 jours de fermentation, les trois milieux ont été distillés séparément afin d'extraire le bioéthanol produit par fermentation, les mélanges miscibles possédant des températures d'ébullition différentes sont séparés durant cette distillation et la substance produite est récupérée dans le ballon (Figure 27).



Figure 27 : Produit récupéré dans le ballon après distillation

6. Analyse des produits obtenus par détermination de la densité

La méthode utilisée dans ce travail est basée sur la relation entre la densité du produit suspecté d'être de l'éthanol et sa masse volumique, qui est convertie pour obtenir la concentration et la pureté du bioéthanol à l'aide de la table de concentration de l'éthanol (tableau 01, annexe III) dont l'échantillon d'éthanol est utilisé comme contrôle (Figure 28).

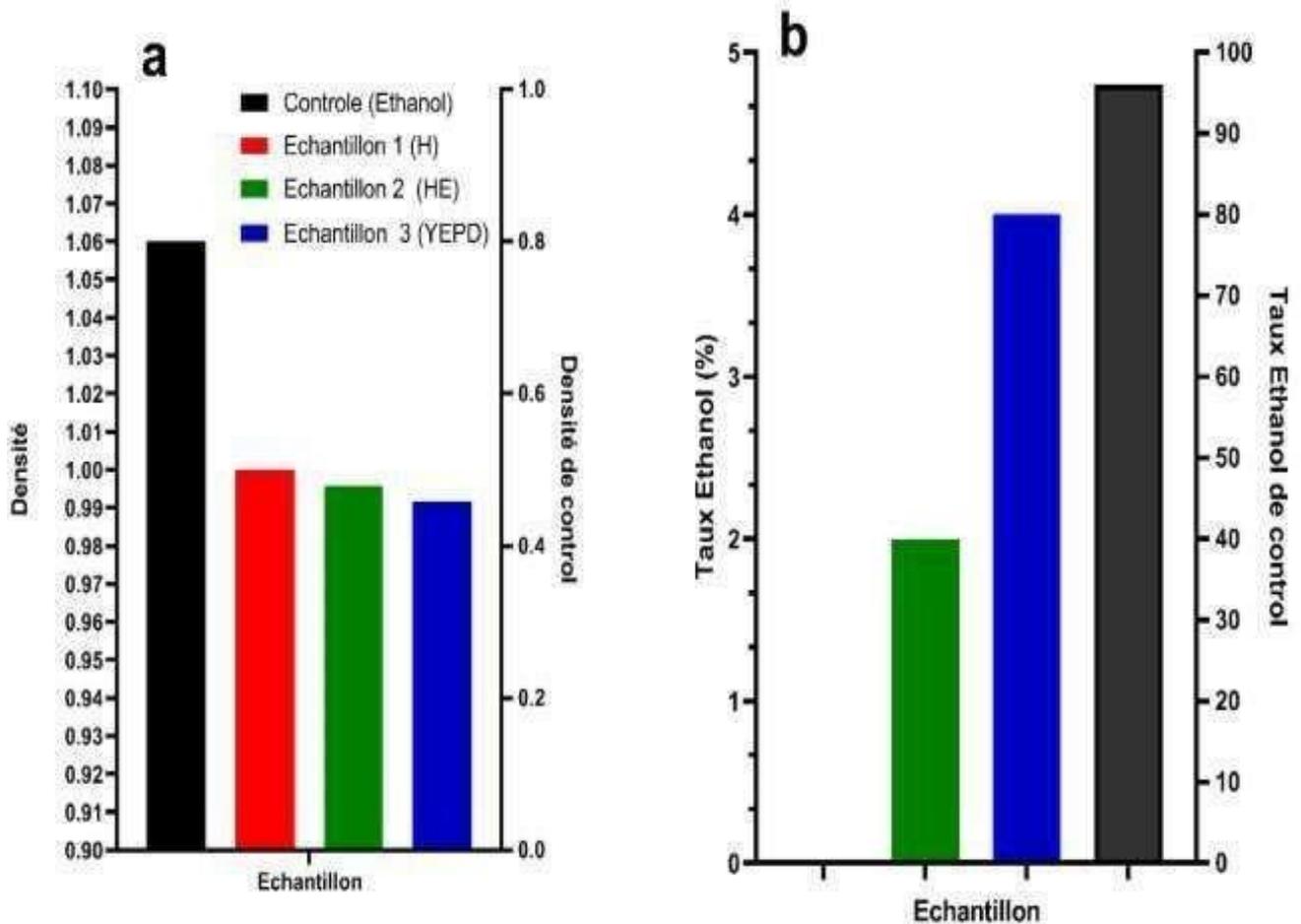


Figure 28 : Valeurs de densité des échantillons testés (a) et leur teneur en éthanol (b)

En référence à la table de concentration de la mixture eau - éthanol à différentes températures (Annexe III) à 20 °C, la valeur 0,808 g/cm³ correspond à de l'éthanol à 95%.

Pour l'échantillon (H) une densité de valeur 1 a été obtenue, ce qui est synonyme à l'absence d'éthanol dans ce dernier, car la valeur 1 correspond à la densité de l'eau.

La mesure de la densité de l'échantillon (HE) s'est effectuée à l'aide d'une éprouvette de 5 ml en raison de la faible quantité de notre échantillon et pour obtenir des résultats plus fiables et précis. En référence à la table de concentration, on déduit que le résultat obtenu correspond à de l'éthanol à **2%**. Quant au dernier échantillon (YEPD), la valeur obtenue 0,9918 g/cm³ correspond à de l'éthanol à **4%**.

On observe que la concentration finale en bioéthanol se diffère d'un milieu à l'autre, ce qui signifie que l'enrichissement des milieux de culture rend la levure plus active.

Conclusion

Face à l'intensification du changement climatique et de la crise énergétique mondiale, les stratégies de gestion durable des ressources, telles que les bioraffineries et les systèmes de récupération des ressources, deviennent de plus en plus essentiels. En général, ces systèmes font appel à des technologies innovantes de valorisation des ressources naturelles et à de nouveaux matériaux renouvelables. La valorisation de la biomasse peut jouer un rôle fondamental dans ces systèmes, car elle permet de produire de l'énergie (biocarburants) ainsi qu'une large gamme de produits biosourcés grâce au concept de bioraffinerie.

L'objectif de ce travail est de valoriser par voie biologique des déchets de l'industrie papetière, en utilisant des enzymes cellulolytiques produites par fermentation fongique sur un substrat solide. Les déchets de carton issus de la vie urbaine peuvent être transformés en sucres fermentescibles. Pour ce faire, la souche fongique *d'Aspergillus niger* a été utilisée pour produire des cellulases par fermentation en milieu solide de deux types de déchets (carton et poudre de carton).

Des fermentations en milieu solide sont réalisées à 28°C pendant 7 jours avec une culture *d'Aspergillus niger* souche BG et des déchets de carton (carton et poudre de carton) comme seule source de carbone, afin de produire un complexe enzymatique capable de dégrader complètement la cellulose du carton en sucre simple (glucose).

Les résultats de la fermentation en milieu solide des deux échantillons avec *Aspergillus niger* strain BG obtenus après 7 jours d'incubation à 28°C, montrent que les meilleurs rendements en enzymes cellulolytiques ont été obtenus dans le cas du carton, avec une production d'exoglucanase (3663,41 U/mL), d'endoglucanase (69,39 U/mL) et de β -glucosidase (21,12 U/mL) plus élevée que dans le cas du carton en poudre.

L'ultrafiltration de l'extrait enzymatique révèle une augmentation des activités endoglucanases (284 U/mL), exoglucanases (12932,94 U/mL) et β -glucosidase (37,75 U/mL).

A travers ces résultats intéressants, il est essentiel de poursuivre les investigations de recherche et d'exploitation de complexes enzymatiques produits dans les processus biotechnologiques. Ce procédé présente l'intérêt d'être à la fois dépolluant et valorisant, puisqu'il permet de réduire considérablement la quantité de déchets de l'industrie papetière en les valorisant par saccharification pour obtenir une source de carbone, et par fermentation pour produire de l'énergie renouvelable.

La pureté et la concentration du bioéthanol contenu dans les trois échantillons ont été déterminées par une mesure de densité. Les résultats ont montré que la production de bioéthanol dans l'hydrolysat non enrichi était nulle, tandis qu'elle était respectivement de 2 % et 4 % dans l'hydrolysat enrichi et l'hydrolysat (YEFD) contenant 10% de glucose.

Ce travail a permis de conclure que le carton peut être un milieu conventionnel pour la production de bioéthanol après fermentation des sucres par des levures, principalement des souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

Enfin, ces résultats ouvrent d'autres perspectives qui consistent à :

- Tester les différentes applications potentielles de ces extraits enzymatiques.
- Optimiser les rendements de saccharification
- Optimiser les rendements de la production de bioéthanol
- Mettre en application industrielle la production du bioéthanol

Références

Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

ADEME, (2019). Tour d’horizon des avantages et des perspectives de développement des procédés de pyrolyse et de gazéification.

Agence nationale des déchets (2022). Production de 11,1 mns de tonnes de déchets ménagers et assimilés en 2021. Retrieved April 8, 2023, from <https://www.aps.dz/economie/149173-and-production-de-11-1-mns-de-tonnes-de-dechets-menagers-et-assimiles-en-2021>

Ahmad, N., & Zakaria, M. R. (2019). Oligosaccharide from hemicellulose. In *Lignocellulose for future bioeconomy*, 135-152.

Aid, A., Bouadam, R. (2021). Pour une gestion intégrée des déchets ménagers et assimilés dans la ville de Bejaia : Esquisse d’une approche de coordination entre les acteurs. *Architecture et environnement de l’enfant*, 6(2), 25–39.

Alam, M. M., Maniruzzaman, M., & Morshed, M. M. (2014). Application and Advances in Microprocessing of Natural Fiber (Jute)–Based Composites. *Comprehensive Materials Processing*, 7, 243–260.

Alfenore, S., Molina J., Carole. (2016). De la conversion microbienne des ressources lignocellulosiques pour la production de molécules énergétiques : verrous et perspectives. *Innovations Agronomiques*, vol (54), pp. 89-104

Alio, M. A. (2020). Production de bioéthanol à partir d'une biomasse lignocellulosique multiressources locale par prétraitement Organosolv et hydrolyse enzymatique (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne [2017-2020]).

Ang, SK, Yahya, A., Abd Aziz, S., & MdSalleh, M. (2015). Isolement, criblage et identification de producteurs cellulolytiques et xylanolytiques potentiels pour la biodégradation du tronc de palmier à huile non traité et son application à la saccharification des feuilles de citronnelle. *Biochimie préparatoire et biotechnologie*, 45 (3), 279-305.

Anonyme (a), 2023. Valorisation des déchets : Un moteur de l’économie nationale - Actualité : EL Moudjahid Retrieved April 2, 2023, from <https://www.elmoudjahid.dz/fr/actualite/valorisation-des-dechets-un-moteur-de-l-economie-nationale-184607>

Augier, H. (2008). Le livre noir de l'environnement, Ed. Alphée, Jean, Paul, Bernard, 601p
Azzouz, Z., Bettache, A., Boucherba, N., Amghar, Z., Benallaoua, S. (2020). Optimization of xylanase production by newly isolated strain *Trichoderma afroharzianum* isolate az 12 in solid state fermentation using response surface methodology. *Cellul. Chem. Technol.* 54, 451462

Azzouz, Z., Bettache, A., Boucherba, N., Prieto, A., Martinez, M.J., Benallaoua, S., de Eugenio, L.I. (2021). Optimization of B-1,4-Endoxylanase Production by an *Aspergillus niger* Strain Growing on Wheat Straw and Application in Xylooligosaccharides Production. *Molecules* 26, 2527.

B

Bailey, M. J., Biely, P., & Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of biotechnology*, 23(3), 257-270.

Baloul, H. (2008). Evaluation des émissions polluantes issues de l'incinération des déchets spéciaux au niveau de l'entreprise ECFERAL (Doctoral dissertation, Ecole nationale polytechnique).

Bano, S., Qader, SAU, Aman, A., Syed, MN et Durrani, K. (2013). Production élevée d'endo1, 4-β-D-glucanase dégradant la cellulose en utilisant la bagasse comme substrat de *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Polymères glucidiques*, 91 (1), 300-304.

Bansal, N., Tewari, R., Soni, R., & Soni, S. K. (2012). Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*, 32(7), 1341–1346.

Barbosa, F. C., Silvello, M. A., & Goldbeck, R. (2020). Cellulase and oxidative enzymes : new approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production. *Biotechnology Letters*, 42(6), 875–884

Bayard, R., & Gourdon, R. (2022). Traitements biologiques des déchets solides. *Chimie Verte*.

- Benhamou, K. (2015).** Extraction de nanofibrilles de cellulose à structure et propriétés contrôlées : caractérisation, propriétés rhéologiques et application nanocomposites [Université Grenoble Alpes ; Université Cadi Ayyad (Marrakech, Maroc)].
- Betrouni, M. S. (2018).** Récupération et retraitement des composants de certains déchets des Equipements Electriques et Electroniques (DEEE) [Université de Lille].
- Birch, R. M., & Walker, G. M. (2000).** Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9–10), 678–687
- Birch, R. M., Ciani, M., & Walker, G. M. (2003).** Magnesium, calcium and fermentative metabolism in wine yeasts. *Journal of Wine Research*, 14(1), 3-15.
- Bisson, L. F. (1999).** Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 107-119.
- Bollók, M., & Réczey, K. (2000).** Cellulase enzyme production by various fungal strains on different carbon sources. *Acta Alimentaria*, 29(2), 155–168.
- Bornscheuer, U., Buchholz, K., & Seibel, J. (2014).** Enzymatic degradation of (ligno) cellulose. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(41), 10876-10893.
- Bouadam, R. (2022).** L'Algérie face à ses déchets : outils et entraves de gestion vers quelles perspectives ? *Architecture et environnement de l'enfant*, 7, 65–79.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brijwani, K. (2011).** *Solid state fermentation of soybean hulls for cellulolytic enzymes production : physicochemical characteristics, and bioreactor design and modeling*. Kansas State University.
- Byadgi, S. A., & Kalburgi, P. B. (2016).** Production of Bioethanol from Waste Newspaper. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 555–562.

C

Chatterjee, R., Gajjela, S., & Thirumdasu, R. K. (2017). Recycling of Organic Wastes for Sustainable Soil Health and Crop Growth. *International Journal of Waste Resources*, 07(03).

Chen, H., Han, Y. et Xu, J. (2008). Saccharification et fermentation simultanées de paille de blé explosée à la vapeur prétraitée au peroxyde alcalin. *Biochimie des procédés*, 43 (12), 14621466

Ciolacu, D., Ciolacu, F., & Popa, V. I. (2011). Amorphous cellulose—structure and characterization. *Cellulose chemistry and technology*, 45(1), 13.

Corkal, V., Levin, J., & Gass, P. (2020). Subventions fédérales aux combustibles fossiles au Canada en 2020

D

Dar. R.A., Saba. I., Shahnawaz. M., Sangale. M.K., Ade.A.B., Rather. S.A., Qazi. P.H. (2013). Isolation, purification and characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from endophytic *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin. *Advances in Enzyme Research*. 1(4). 91-9

Denis, M. (2021). Vers le développement de l'impression covalente spatio-contrôlée ultrarapide. (Doctoral dissertation, Nantes).

Djeddou, S., Boutemak, K., Cheknane, B., Hadj-Ziane, A., & Ayoub, F. M. (2018). Etude de la production de bioéthanol de deuxième génération à partir d'un déchet agroalimentaire. *Journal of Renewable Energies*, 21(3), 385-390.

Djemaci, B. (2012). La gestion des déchets municipaux en Algérie : Analyse prospective et éléments d'efficacité [Université de Rouen].

Duodu, M. G., Singh, B., & Christina, E. (2022). Waste management through bioremediation technology : An eco-friendly and sustainable solution. *Relationship Between Microbes and the Environment for Sustainable Ecosystem Services, Volume 2 : Microbial Mitigation of Waste for Sustainable Ecosystem Services*, 5, 205–234.

E

El-Hadi, A. A., El-Nour, S. A., Hammad, A., Kamel, Z., & Anwar, M. (2014). Optimization of cultural and nutritional conditions for carboxymethylcellulase production by *Aspergillus hortai*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(1), 23–28.

Eloutassi, N., Louaste, B., Boudine, L., & Remmal, A. (2014). Hydrolyse physico-chimique et biologique de la biomasse lignocellulosique pour la production de bio-éthanol de deuxième génération. *Revue Nature et Technologie*, 6(1), 10–14.

F

Fellous, M., Kamoun, M., Wiels, J., Dausset, J., Clements, G., Zeuthen, J., & Klein, G. (1977). Induction of HLA expression in Daudi cells after cell fusion. *Immunogenetics*, 5, 423-436.

Foyle, T., Jennings, L., & Mulcahy, P. (2007). Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. *Bioresource Technology*, 98(16), 3026–3036.

Funnell-Harris, D. L., Pedersen, J. F., & Sattler, S. E. (2010). Alteration in Lignin Biosynthesis Restricts Growth of *Fusarium* spp. in Brown Midrib Sorghum., 100(7), 671–681.

G

Garedew, M., Lam, C. H., Petitjean, L., Huang, S., Song, B., Lin, F., ... & Anastas, P. T. (2021). Electrochemical upgrading of depolymerized lignin: a review of model compound studies. *Green Chemistry*, 23(8), 2868-2899.

Ghose.T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59(2). 257– 268.

Goldbeck, R., Ramos, MM, Pereira, GA et Maugeri-Filho, F. (2013). Production de cellulase à partir d'une nouvelle souche *Acremonium strictum* isolée du biome brésilien à l'aide de différents substrats. *Technologie des bioressources*, 128 , 797-803.

Green, D. W., & Southard, M. Z. (2019). Perry's chemical engineers' handbook. McGrawHill Education.

Guo, H., Chang, Y. et Lee, DJ (2018). Saccharification enzymatique de la bioraffinerie lignocellulosique : axes de recherche. *Technologie des bioressources*, 252, 198-215.

H

Hamzaoui, S. (2011). Gestion et impact des déchets solides urbains sur l'environnement, ELTARF commune, mémoire de magister, Université Badji Mokhtar, Annaba

Handa, CL, Couto, UR, Vicensoti, AH, Georgetti, SR et Ida, EI (2014). Optimisation des paramètres de fermentation de la farine de soja pour produire de la β -glucosidase pour la bioconversion en aglycones. *Chimie alimentaire*, 152, 56-65.

Haoues, N. (2009). Contribution à la modélisation des structures sandwich de type carton ondulé, mémoire de magister, Université Mohamed Khider, Biskra

Hasper, A. A., Dekkers, E., van Mil, M., van de Vondervoort, P. J., & de Graaff, L. H. (2002). EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1556-1560

Hou, C. (2016). Le droit des déchets : étude comparatiste France - Chine. Thèse De Doctorat

Hu, L., Fang, X., Du, M., Luo, F., & Guo, S. (2020). Hemicellulose-based polymers processing and application. *American Journal of Plant Sciences*, 11(12), 2066-2079.

I

Imbert, A. (2017). Vers une voie de valorisation du hêtre : synthèse de monomères furaniques biosourcés et furfurylation, thèse de doctorat, Université de Lorraine.

J

Jensen, C. U., Rodriguez Guerrero, J. K., Karatzos, S., Olofsson, G., & Iversen, S. B. (2017). Fundamentals of Hydrofaction TM : Renewable crude oil from woody biomass.

Biomass Conversion and Biorefinery, 7(4), 495–509.

Jørgensen, H., Mørkeberg, A., Krogh, KB et Olsson, L. (2004). Croissance et production d'enzymes par trois espèces de *Penicillium* sur des monosaccharides. *Journal de biotechnologie*, 109 (3), 295-299.

Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire N° 77. (2001). Conventions et accords internationaux – lois et décrets, arrêtés, décisions, avis, communications et annonces. pp 8

Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M., & Viikari, L. (2005). Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources.

Process Biochemistry, 40(11), 3519–3525.

K

Kabongo, J. D. (2013). Waste Valorization. *Encyclopedia of Corporate Social Responsibility*, 2701–2706.

Katahira, R., Elder, T. J., & Beckham, G. T. (2018). Lignin Valorization. *RSC Energy and Environment Series*, (19), 1–20.

Khellil, O. (2017). Production de cellulase et d'enzymes associées par des souches de *Bacillus* sp. : Le rôle des prétraitements et l'effet des polyphénols, des flavonoïdes et des biosurfactants. Université d'Oran

Kple, M. (2015). Etude des voies de valorisation des déchets ménagers au Benin : Cas de la ville d'Abomey-Calavi. Thèse De Doctorat, 268.

Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 2011(1)

Kumar Gupta, P., Sai Raghunath, S., Venkatesh Prasanna, D., Venkat, P., Shree, V., Chithananthan, C., Choudhary, S., Surender, K., & Geetha, K. (2019). An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. In Cellulose. IntechOpen.

L

Lachat, A. (2022). Le réemploi appliqué au domaine de la construction : principe, impact environnemental et mesure dans le cadre d'une économie circulaire. Ecole des ponts ParisTech.

Lebon, E. (2019). Optimisation de la méthanisation sèche des déchets ménagers (Doctoral dissertation, Université de la Réunion).

M

Makhlouf, J. (2019). Caractérisation de la biodiversité des souches d'*Aspergillus* de la section Flavi isolées d'aliments commercialisés au Liban : approche moléculaire, métabolique et morphologique (Doctoral dissertation).

Mandels, MARY, Weber, J., (1969). The Production of Cellulases, *Food Microbiology*, 817–830.

Messai, F. R., & Ghenouchi, A. (2015). Urbanisation et gestion des déchets solides urbains : Cas de la ville d'Oum El Bouaghi, mémoire de magister, Université d'Oum El Bouaghi

Millati, R., Cahyono, R. B., Ariyanto, T., Azzahrani, I. N., Putri, R. U., & Taherzadeh, M. J. (2019). Agricultural, Industrial, Municipal, and Forest Wastes: An Overview. *Sustainable Resource Recovery and Zero Waste Approaches*, 1–22.

Miller, GL (1959). Utilisation du réactif acide dinitrosalicylique pour la détermination des sucres réducteurs. *Chimie analytique*, 31 (3), 426-428.

Modenbach, A. A., & Nokes, S. E. (2013). Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings—a review. *Biomass and Bioenergy*, 56, 526-544

Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. P. J. (2011). 21st Century Guidebook to Fun. 21st Century Guidebook to Fun.

Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *190*(4), 1157-1195.

Murat, M. (1981). Valorisation des déchets et de sous-produits industriels. Ed, MASSON.
Paris.326p

Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimarães, P. M. R., Silva, J. P. A., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., Vicente, A., Domingues, L., & Teixeira, J. A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, *28*(6),

N

Navarro, D., Couturier, M., Damasceno da Silva, GG, Berrin, JG, Rouau, X., Asther, M., & Bignon, C. (2010). Dosage automatisé pour le criblage de la libération enzymatique de sucres réducteurs à partir de biomasse micronisée. *Fabriques de cellules microbiennes*, *9* (1), 1-12.

Noor, T., Javid, A., Hussain, A., Bukhari, S. M., Ali, W., Akmal, M., & Hussain, S. M. (2020). Types, sources and management of urban wastes. *Urban Ecology : Emerging Patterns and Social-Ecological Systems*, 239–263.

Nzihou, A. (2010). Toward the valorization of Waste and Biomass. *Waste and Biomass Valorization*, *1*(1), 3-7.

O

Oh, E. J., & Jin, Y. S. (2020). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient fermentation of cellulose. *FEMS Yeast Research*, *20*(1).

P

Pandey, V. C., Gajić, G., Sharma, P., & Roy, M. (2022). Soil and phytomanagement for adaptive phytoremediation practices. *Adaptive Phytoremediation Practices*, 135–179.

Petterson, L. G. (1975). The mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulose. In Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Helsinki, Finland, SITRA, 255-261.

Poursat, A. (2015). L'analyse des constituants chimiques du bois au sein de populations génétiques de Peuplier noir pour faire de la sélection d'individus pour des besoins de production énergétique, 35 p

Puspitasari, F. H., Supriyadi, S., & Al-Irsyad, M. (2022). Analysis of Organic and Inorganic Waste Management Towards a Green Campus at Universitas Negeri Malang. *Proceedings of the 3rd International Scientific Meeting on Public Health and Sports (ISMOPHS 2021)*, 44,68–76.

R

Rana, S., & Kaur, M. (2012). Isolation and screening of cellulase producing microorganisms from degraded wood. *Int. J. Pharm. Biol. Sci. Fund*, 2, 10-15.

Rocher, L. (2008). Les contradictions de la gestion intégrée des déchets urbains : l'incinération entre valorisation énergétique et refus social. Flux - Cahiers Scientifiques Internationaux Réseaux et Territoires, 2008/4(74), 22–29.

Roussos, S., & Raimbault, M. (1982). Hydrolysis of cellulose by fungi. II. Production of cellulases by *Trichoderma harzianum* by fermentation in liquid media. In *Annales de Microbiologie* (Vol. 133, No. 3, pp. 465-474).

Ruan, R., Ding, K., Liu, S., Peng, P., Zhou, N., He, A., Chen, P., Cheng, Y., Wang, Y., Liu, Y., Lei, H., Addy, M., & Cobb, K. (2020). Gasification and pyrolysis of waste. *Current Developments in Biotechnology and Pandey*, V.

S

Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production : concepts and recent developments. 3 *Biotech*, 5(4), 337–353

Scriban R. (1993). Biotechnologie. 4^{ème} édition. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. 40

Siedmto. (2020). Durée de vie des déchets, from <https://www.siedmto.fr/tri-et-prevention-desdechets/duree-de-vie-des-dechets/>

Singh, L. K., & Chaudhary, G. (2017). Advances in biofeedstocks and biofuels. Volume two, Production technologies for biofuels. Retrieved

Singh, M., Pandey, N., Dwivedi, P., Kumar, V., & Mishra, B. B. (2019). Production of xylose, levulinic acid, and lignin from spent aromatic biomass with a recyclable Bronsted acid synthesized from d-limonene as renewable feedstock from citrus waste. *Bioresource Technology*, 293.

Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, 500–507.

Slimani, A. (2022). Collecte des ordures ménagères à Béjaïa : Nacéria à l’abandon, L’Expression : Société, from <https://www.lexpressiondz.com/societe/naceria-a-labandon358004>

Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. de S., Medeiros, A. B. P., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., Pitarelo, A. P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L. M. F., Ferrara, M. A., Silva Bon, E. P. da, Moraes, L. M. P. de, Araújo, J. de A., & Torres, F. A. G. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*, 101(13), 4820–4825.

Soni, R., Nazir, A. et Chadha, BS (2010). Optimisation de la production de cellulase par une souche polyvalente d'*Aspergillus fumigatus* fresenius (AMA) capable d'un désencrage efficace et d'une hydrolyse enzymatique des floes Solka et de la bagasse. *Cultures et produits industriels*, 31 (2), 277-283.

Sun, N., Rodríguez, H., Rahman, M., & Rogers, R. D. (2010). Where are ionic liquid strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass? *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 47(5), 1405–1421.

Sutarti, S., Muttaqin, Z., & Setyawan, A. (2019). Utilization of Organic and Inorganic Waste Diversification to Improve Families Income in Pangung Jati Taktakan Serang.

T

Tesfaw, A., & Assefa, F. (2014). Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* : Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–11.

Turcotte, B., Liang, X. B., Robert, F., & Soontorngun, N. (2009). Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS yeast research*, 10(1), 2-13.

V

Vignesh, K. S., Rajadesingu, S., & Arunachalam, K. D. (2021). Challenges, issues, and problems with zero-waste tools. Concepts of Advanced Zero Waste Tools: Present and Emerging Waste Management Practices, 69–90.

W

Watanabe, H., & Tokuda, G. (2010). Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 55, 609–632

Watson, D.L., Wilson, D.B., Walker, L.P., (2002). Synergism in binary mixtures of *Thermobifida fusca* cellulases Cel6B, Cel9A, and Cel5A on BMCC and avicel. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2002 1012 101, 97–111

Y

Yang, H. C., Zhong, W., Hou, J., Chen, V., & Xu, Z. K. (2017). Janus hollow fiber membrane with a mussel-inspired coating on the lumen surface for direct contact membrane distillation. *Journal of Membrane Science*, 523, 1-7.

Z

Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources : Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *71*, 475–501.

Zhang Percival, YH, Berson, E., Sarkanen, S. et Dale, BE (2009). Séances 3 et 8 : prétraitement et récalcitrance de la biomasse : fondamentaux et avancées. *Biochimie appliquée et biotechnologie*, *153 (1)*, 80-83.

Zhang, J. G., Li, Q. M., Thakur, K., Faisal, S., & Wei, Z. J. (2017). A possible water-soluble inducer for synthesis of cellulase in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, *226*, 262–266.

Zhang, Q.Z., Cai, W.M., 2008. Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3. *Biomass and Bioenergy* *32*, 1130–1135.

Zoghلامي, A., & Paës, G. (2019). Lignocellulosic biomass: understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. *Frontiers in chemistry*, *7*, 874.

Annexes

Matériel Analytique :

- Four Pasteur (Heraeus, Allemagne)
- Dessiccateur (MOC - 120 H Shimadzu, France)
- Etuve (Nüve, EN 055)
- Centrifugeuse (Rotina 380R, Allemagne)
- Spectrophotomètre (UVmini-1240 Shimadzu)
- Papier Whatman N°1, Amicon Ultra-15 (Merck-Millipore)
- Filtres à seringue de 0,45 et 0,22 μM (Merck-Millipore)
- Bioréacteur de 3L(Lambda Minifor)
- Rotavapor (Stuart, RE300DB)
- Pycnomètre (Marienfeld, Allemagne)
- Balance analytique (RADWAG, AS 220/C/2).

Milieux de culture et réactifs

Tableau I : Solution Mandels et Weber (Mandels et Weber, 1969)

Composant	Quantité
K_2HPO_4 (NH_4) $_2SO_4$	2 g
Urée	1.4 g 0.3 g
$MgSO_4, 7H_2O$	0.3 g
$CaCl_2$	0.3 g
$FeSO_4, 7H_2O$	5.0 mg
$MnSO_4, H_2O$	1.56 mg
$ZnSO_4, 7H_2O$	1.4 mg
$COCL_2$	2.0 mg
Eau distillée	1 litre
La source de carbone	1 % de CMC
pH	5

Tableau II : Tampon citrate de sodium (50 mM, pH 5) (Zhang et al., 2009)

Composant	Quantité	Concentration
Citrate de sodium dihydraté (M : 258,06 g/mol)	12.49 g	0,0481 M
Acide citrique (M : 192,12 g/mol)	0.37g	0,0019 M

Préparer 800 ml d'eau distillée dans un récipient approprié.

Ajouter 12.49g de citrate de sodium dihydraté à la solution. Ajouter

0.37g d'acide citrique à la solution.

Ajuster la solution au pH final de 5 en utilisant HCl ou NaOH (1N)

Ajouter de l'eau distillée jusqu'à ce que le volume soit de 1L.

Tableau III : Réactif de DNS (Ghose, 1987)

Composant	Quantité
DNS	10 g
NaOH	16 g
Tartrate double de sodium et de potassium	300 g
Eau distillée	1L

Tableau IV : Milieu YEPD

Composant	Quantité
Peptone	3 g
Extrait de levure	1,5 g
Glucose	15 g

Tableau V : Milieu d'enrichissement (Djeddou et al., 2018)

Composant	Quantité
Extrait de Malt	20 g
Extrait de levure	0,5 g
MgSO₄ / H₂O	2 g
(NH₄)₂SO₄	6 g
KH₂PO₄	0,5 g
CaCl₂	0,1 g
FeSO₄ , 7H₂O	0,1 g

Courbes d'étalonnage

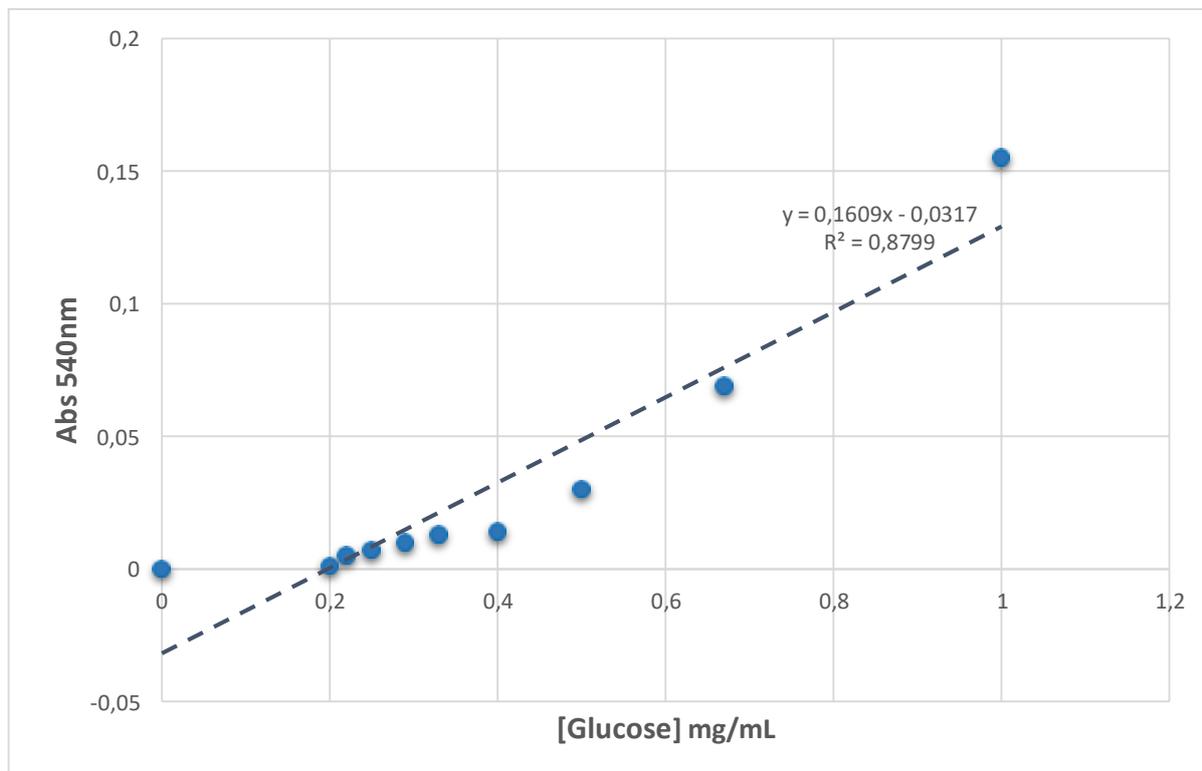


Figure 01 : Courbe d'étalonnage de glucose à 2g/L

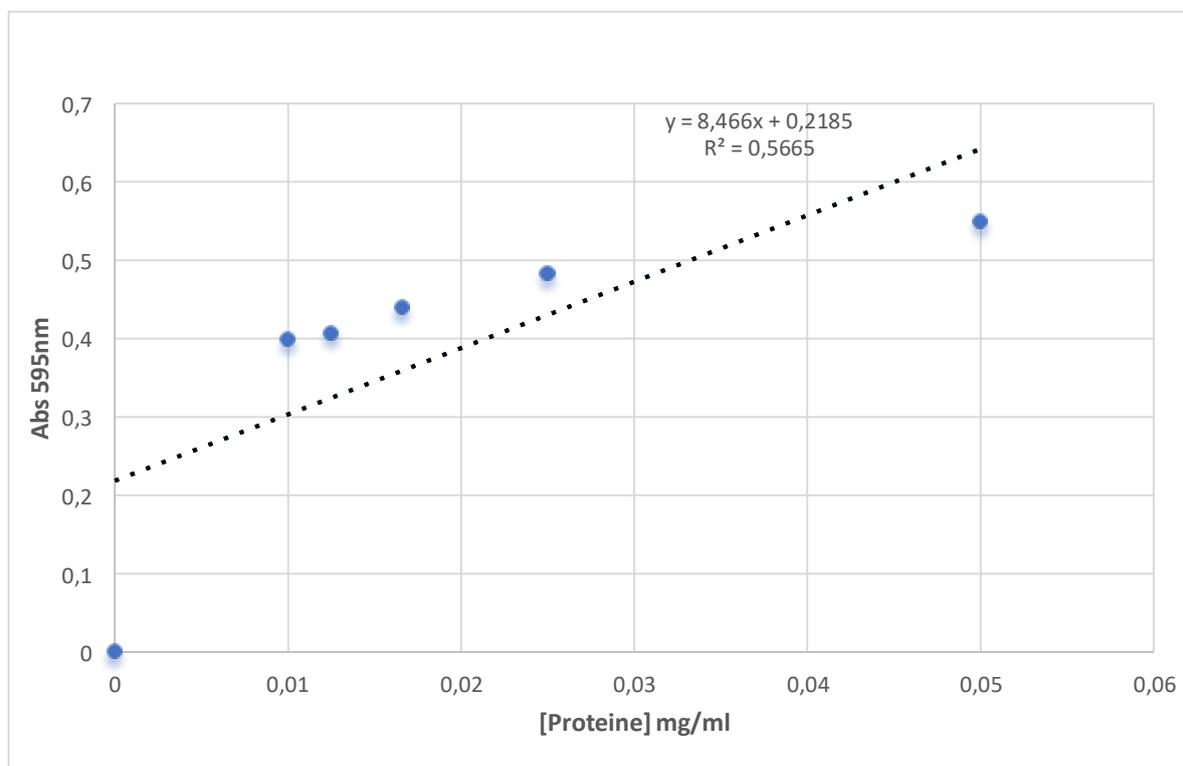


Figure 02 : Courbe d'étalonnage des protéines

Tableau I : Table de concentration de la mixture eau - éthanol à différentes températures

wt % Ethanol	Temperature (degC)				wt % Ethanol	Temperature (degC)			
	20	25	30	35		20	25	30	35
0	0.99823	0.99708	0.99568	0.99406	50	0.91384	0.90985	0.90580	0.90168
1	0.99636	0.9952	0.99379	0.99217	51	0.91160	0.90760	0.90353	0.89940
2	0.99453	0.99336	0.99194	0.99031	52	0.90936	0.90534	0.90125	0.89710
3	0.99275	0.99157	0.99014	0.98849	53	0.90711	0.90307	0.89896	0.89479
4	0.99103	0.98984	0.98839	0.98672	54	0.90485	0.90079	0.89667	0.89248
5	0.98938	0.98817	0.98679	0.98501	55	0.90258	0.89850	0.89437	0.89016
6	0.9878	0.98656	0.98507	0.98335	56	0.90031	0.89621	0.89206	0.88784
7	0.98627	0.98500	0.98347	0.98172	57	0.89803	0.89392	0.88975	0.88552
8	0.98478	0.98346	0.98189	0.98009	58	0.89574	0.89162	0.88744	0.88319
9	0.98331	0.98193	0.98031	0.97846	59	0.89344	0.88931	0.88512	0.88085
10	0.98187	0.98043	0.97875	0.97685	60	0.89113	0.88699	0.88278	0.87851
11	0.98047	0.97897	0.97723	0.97527	61	0.88882	0.88466	0.88044	0.87615
12	0.97910	0.97753	0.97573	0.97371	62	0.88650	0.88233	0.87809	0.87379
13	0.97775	0.97661	0.97424	0.97216	63	0.88417	0.87998	0.87574	0.87142
14	0.97643	0.97472	0.97278	0.97063	64	0.88183	0.87763	0.87337	0.86905
15	0.97514	0.97334	0.97133	0.96911	65	0.87948	0.87527	0.87100	0.86667
16	0.97387	0.97199	0.96990	0.9676	66	0.87713	0.87291	0.86863	0.86429
17	0.97259	0.97062	0.96844	0.96607	67	0.87477	0.87054	0.86625	0.86190
18	0.97129	0.96923	0.96697	0.96452	68	0.87241	0.86817	0.86387	0.85950
19	0.96997	0.96782	0.96547	0.96294	69	0.87004	0.86579	0.86148	0.85710
20	0.96864	0.96639	0.96395	0.96134	70	0.86766	0.86340	0.85908	0.85470
21	0.96729	0.96495	0.96242	0.95973	71	0.86527	0.86100	0.85667	0.85228
22	0.96592	0.96348	0.96087	0.95809	72	0.86287	0.85859	0.85426	0.84986
23	0.96453	0.96199	0.95929	0.95643	73	0.86047	0.85618	0.85184	0.84743
24	0.96312	0.96048	0.95769	0.95476	74	0.85806	0.85376	0.84941	0.84500
25	0.96168	0.95895	0.95607	0.95306	75	0.85564	0.85134	0.84698	0.84257
26	0.96020	0.95738	0.95442	0.95133	76	0.85322	0.84891	0.84455	0.84013
27	0.95867	0.95576	0.95272	0.94955	77	0.85079	0.84647	0.84211	0.83768
28	0.95710	0.95410	0.95098	0.94774	78	0.84835	0.84403	0.83966	0.83523
29	0.95548	0.95241	0.94922	0.94590	79	0.84590	0.84158	0.83720	0.83277
30	0.95382	0.95067	0.94741	0.94403	80	0.84344	0.83911	0.83473	0.83029
31	0.95212	0.94890	0.94557	0.94214	81	0.84096	0.83664	0.83224	0.82780
32	0.95038	0.94709	0.94370	0.94021	82	0.83848	0.83415	0.82974	0.82530
33	0.94860	0.94525	0.94180	0.93825	83	0.83599	0.83164	0.82724	0.82279
34	0.94679	0.94337	0.93986	0.93626	84	0.83348	0.82913	0.82473	0.82027
35	0.94494	0.94146	0.93790	0.93425	85	0.83095	0.82660	0.82220	0.81774
36	0.94306	0.93952	0.93591	0.93221	86	0.82840	0.82405	0.81965	0.81519
37	0.94114	0.93756	0.93390	0.93016	87	0.82583	0.82148	0.81708	0.81262
38	0.93919	0.93556	0.93186	0.92808	88	0.82323	0.81888	0.81448	0.81003
39	0.93720	0.93353	0.92979	0.92597	89	0.82062	0.81626	0.81186	0.80742
40	0.93518	0.93146	0.92770	0.92385	90	0.81797	0.81362	0.80922	0.80478
41	0.93314	0.92940	0.92558	0.92170	91	0.81529	0.81094	0.80655	0.80211
42	0.93107	0.92729	0.92344	0.91952	92	0.81257	0.80823	0.80384	0.79941
43	0.92897	0.92516	0.92128	0.91733	93	0.80983	0.80549	0.80111	0.79669
44	0.92685	0.92301	0.91910	0.91513	94	0.80705	0.80272	0.79835	0.79393
45	0.92472	0.92085	0.91692	0.91291	95	0.80424	0.79991	0.79555	0.79114
46	0.92257	0.91868	0.91472	0.91069	96	0.80138	0.79706	0.79271	0.78831
47	0.92041	0.91649	0.91250	0.90845	97	0.79846	0.79415	0.78981	0.78542
48	0.91823	0.91426	0.91028	0.90621	98	0.79547	0.79117	0.78684	0.78247
49	0.91604	0.91208	0.90805	0.90396	99	0.79243	0.78814	0.78382	0.77946
					100	0.78934	0.78506	0.78075	0.77641

NOTE

Numbers obtained from Table 3-110 (pg 3-89) "Perry's Chemical Engineers' Handbook", 6th Ed.

Résumé

L'objectif de ce travail était de valoriser par voie biologique un déchet de l'industrie papetière. Une fermentation solide a été réalisée en utilisant la souche *Aspergillus niger* pour produire des enzymes cellulolytiques. Les activités enzymatiques des extraits bruts récupérés après fermentation ont permis de montrer que le carton produisait plus d'enzymes que la poudre de carton. L'extrait enzymatique de l'échantillon sélectionné a ensuite été filtré et stérilisé, puis une saccharification a été réalisée pour convertir la cellulose présente dans le carton en sucres fermentescibles (glucose). Ce glucose obtenu à la fin de la saccharification est utilisé comme seule source d'énergie pour la fermentation par la souche *Saccharomyces cerevisiae* en vue de la production de bioéthanol. Trois milieux différents ont été testés pour la fermentation : un milieu enrichi en sources minérales, un milieu YEPD riche en glucose et un hydrolysate non enrichi. La cinétique de croissance de la souche *Saccharomyces cerevisiae* a été suivie pendant 120 heures. La densité des échantillons récupérés après la fermentation a été mesurée après distillation. Ces résultats ont montré des pourcentages d'éthanol différents pour les 3 différents milieux, le YEPD montrant un rendement de 4% d'éthanol suivi par le milieu enrichi avec 2%, tandis que pour l'hydrolysate non enrichi, aucune production d'éthanol n'a été enregistrée.

Mots-clés: Valorisation, Carton, Cellulases, Saccharification, Fermentation, Bioéthanol.

Abstract

The aim of this project was the bioprocessing of a waste product from the paper industry. Solid fermentation was carried out using the *Aspergillus niger* strain to produce cellulolytic enzymes. The enzymatic activities of the crude extracts recovered after fermentation showed that cardboard produced more enzymes than cardboard powder. The enzyme extract from the selected sample was then filtered and sterilized, and a saccharification process was carried out to convert the cellulose present in the paperboard into fermentable sugars (glucose). The resulting glucose is used as the sole energy source during fermentation by the *Saccharomyces cerevisiae* strain to produce bioethanol. Three different media were tested for fermentation : one enriched with mineral sources, another YEPD medium rich in glucose, and a non-enriched hydrolysate. *Saccharomyces cerevisiae* growth kinetics were monitored for 120 hours. The density of samples obtained after fermentation and distillation was calculated. Results showed different ethanol percentages for the 3 media, with YEPD yielding 4% ethanol, the enriched medium 2%, and no ethanol production for the unenriched hydrolysate.

Keywords: Cardboard, Valorization, Cellulases, Saccharification, Fermentation, Bioethanol

ملخص

كان الهدف من هذا المشروع هو المعالجة الحيوية لمزيج زبائبات صناعة الورق. تم إجراء التخمير الصلب باستخدام سلالة *Aspergillus niger* لإنتاج إنزيمات تحلل النسيج الخلوي. أظهرت الأنشطة الإنزيمية لمستخلصات الخمام المسترجعة بعد التخمير أن الورق المقوى ينتج إنزيمات أكثر من مسحوق الكرتون. تم بعد ذلك ترشيح مستخلص الإنزيم من العينة المختارة وتطهيرها، وتم إجراء عملية التحويل لتحويل البوليبيروكسيد الموجود في الورق المقوى إلى سكريات قابلة للتخمير (الجلوكوز). يتم استخدام الجلوكوز الناتج كمصدر وحيد للطاقة أثناء التخمير بواسطة سلالة *Saccharomyces cerevisiae* لإنتاج الإيثانول الحيوي. تم اختبار ثلاث وسائط مختلفة للتخمير: واحد غني بالمصادر المعدنية، وآخر YEPD غني بالجلوكوز، ومحتل غير مخصب. تم رصد حركية نمو خميرة الخميرة لمدة 120 ساعة. تم تطوير كثافة العينات المسترجعة بعد التخمير. أظهرت النتائج نسب إيثانول مختلفة للوسائط الثلاثة، مع إنتاج YEPD 4% إيثانول، والوسط المخصب 2%، وعدم إنتاج إيثانول من أجل التحلل المائي غير المخصب.

الكلمات المفتاحية: كرتون، تخمير، إنزيمات، بوليبيروكسيد، تحلل خلوي