

Année Universitaire : 2014-2015

**Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

**Valorisation bioénergétique des margines et du
lactosérum par des souches de levures thermotolérantes**

Présenté par : Ahmed NACIRI

Encadré par :

➤ **Pr. Latifa JAMAI**

Soutenu le : 25 Juin 2015

Devant le jury composé de :

➤ **Pr. Latifa JAMAI**

➤ **Pr. Omar EL FARRICHA**

➤ **Pr. Ali TAHRI JOUTEI**

Résumé

Le présent travail est constitué de trois parties :

La première partie concerne l'évaluation de la charge organique des sous-produits de l'industrie oléicole et laitière (margines, lactosérum) et la possibilité de leur dégradation par les processus biologiques. L'analyse de ces déchets en se basant sur les paramètres DCO et DBO5, a montré que les margines sont plus polluants que le lactosérum qui est plus facile à épurer par les procédés biologiques.

La deuxième partie s'intéresse à l'étude de la fermentation des margines en discontinu au niveau du laboratoire par des souches de levures thermo tolérantes en suspension afin de produire le bioéthanol. Les différents protocoles de dégradation des polyphénols et la matière organique, optimisation des concentrations des margines, cinétique de croissance dans le grand volume, ont montré que la souche H2b1 en comparaison avec les deux autres souches (Gr2 et Gr1) est la plus adaptée à la fermentation alcoolique du déchet étudié qui est hautement nuisible à l'environnement.

La troisième partie de ce travail concerne la synthèse du bioéthanol par la culture en batch à l'échelle laboratoire de trois souches KL3, B et 63 sur le lactosérum protéiné et dé protéiné dans les différents conditions de fermentation. On a constaté que KL3 est performante en terme de résistance à la température, on vut la grande capacité de production de l'éthanol et de masse cellulaire, et que les deux types de lactosérum ont le même effet sur l'efficacité de biosynthèse, donc le lactosérum dé protéiné est très utile pour augmenter la rentabilité économique de sa valorisation en bioénergie.

Mots clés : fermentation en discontinu, souche de levures, Margines, Lactosérum, Bioéthanol, Biodégradation.

Dédicace

Je dédie ce travail à tous ceux qui m'ont soutenu durant toute la période de mon Projet de Fin d'étude, précisément :

- ❖ A mes **chers parents** qui sont sacrifiés durant toutes mes études, Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et vos encouragements. Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation. Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur ! et qui m'ont soutenu durant toute la période de mon Projet de Fin d'Etude.

- ❖ A mes **professeurs** de la filière Master Biotechnologie Microbienne

- ❖ A toute ma famille à qui je préserve tout l'amour et le respect.

- ❖ A tous ceux qui me sont chers.

REMERCIEMENTS

A Madame Latifa Jamaï, Professeur à la Faculté des Sciences de Fès, je vous dois le meilleur accueil que vous m'avez réservé dans le laboratoire, et la mise à ma disposition tous les moyens pour me permettre de réaliser mes recherches dans les meilleures conditions. Vous m'avez tant aidé, et supporté au moment où j'en avais le plus besoin. Chaleureusement je vous remercie pour votre sacrifice.

Aucun mot ne pourrait exprimer mes remerciements et ma vive gratitude, et que le présent travail soit un faible témoignage de ma très haute reconnaissance et mon profond respect.

J'adresse ma profonde reconnaissance à, A Monsieur **Mohammed Ettayebi**, Professeur à la Faculté des Sciences de Fès, qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et mes sincères remerciements pour l'aide qu'il m'a apportée durant la période de Stage.

Je tiens à remercier également Monsieur **Omar El Farricha**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès qui a accepté d'examiner ce travail, c'est un honneur pour moi de le voir siéger parmi les membres de jury de ce mémoire.

A Monsieur **Ali Tahri joutei**, Professeur à la Faculté des Sciences et Technique de Fès, qu'il trouve ici le témoignage de mes vifs remerciements pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'apporter son jugement sur ce travail.

Mes remerciements les plus sincères à tout le personnel de la Faculté des Sciences Dhar Al Mahraz et la Faculté des Sciences et Techniques de Fès et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

➤ **Liste des abréviations :**

DBO5 : Demande Biologique en Oxygène en 5 jours

DCO : Demande Chimique en Oxygène

DO : Densité Optique

ONAS : l'Office National d'Assainissement de Sfax

ONEP : Office Nationale de l'Eau Potable

POU : Protéines d'Organismes Unicellulaires

QSP : Quantité Suffisante Pour

RPM : Rotation Par Minute

YPS : Yeast Peptone Saccharose (Extrait de levure, Peptone, Saccharose)

YPG : Yeast Peptone Glucose (Extrait de levure, Peptone, Glucose)

Résumé

Le présent travail est constitué de trois parties :

La première partie concerne l'évaluation de la charge organique des sous-produits de l'industrie oléicole et laitière (margines, lactosérum) et la possibilité de leur dégradation par les processus biologiques. L'analyse de ces déchets en se basant sur les paramètres DCO et DBO5, a montré que les margines sont plus polluants que le lactosérum ainsi il est plus facile à épurer par les procédés biologiques.

La deuxième partie s'intéresse à l'étude de la fermentation des margines en discontinu au niveau du laboratoire par des souches de levures thermo tolérantes en suspension afin de produire le bioéthanol. Les différents protocoles de dégradation des polyphénols et la matière organique, optimisation des concentrations des margines, cinétique de croissance dans le grand volume, ont montré que la souche H2b1 en comparaison avec les deux autres souches (Gr2 et Gr1) est la plus adaptée à la fermentation alcoolique du déchet étudié qui est hautement nuisible à l'environnement.

La troisième partie de ce travail concerne la synthèse du bioéthanol par la culture en batch à l'échelle laboratoire de trois souches KL3, B et 63 sur le lactosérum protéiné et dé protéiné dans les différents conditions de fermentation. On a constaté que KL3 est performante en terme de résistance à la température, aussi possède grande capacité de production de l'éthanol et la masse cellulaire, ainsi les deux types de lactosérum ont le même effet sur l'efficacité de biosynthèse, donc le lactosérum dé protéiné est très utile pour augmenter la rentabilité économique de sa valorisation en bioénergie.

Mots clés : fermentation en discontinu, souche de levures, Margines, Lactosérum, Bioéthanol, Biodégradation.

• Introduction Générale

Ces dernières années, le développement de l'activité agroindustrielle a engendré une large production de déchets qui sont notamment issus de la transformation des matières premières de l'agriculture. Ceci constitue un vrai problème environnemental : pollution de l'air, du sol et de l'eau. Dans cette étude on s'intéresse aux déchets des industries oléicole et laitière qui sont caractérisés par une charge organique polluante très élevée, leur DBO5 et DCO dépasse largement celles des déchets domestiques (Smithers, 2008).

Pour donner une idée sur l'impact de ces déchets oléicoles au niveau national, considérons par exemple la région de Fès. Les déchets oléicoles constituent le premier pôle de concentration des unités industrielles (42% des huileries marocaines (Achkari-Begdouri, 1994). On estime que pendant la période Oléicole, les margines pourraient représenter les 2/3 de la pollution biodégradable industrielle de la ville et environ la moitié de la pollution totale de l'agglomération de Fès. De ce fait, durant cette période, l'Oued Sebou peut être exempt d'oxygène sur plusieurs dizaines de Kilomètres et par conséquent, toute forme de vie aquatique disparaît (ONEP, 1989). Le suivi de la qualité des eaux de Sebou mené par l'ONEP a montré que l'impact des rejets des Huileries de la ville de Fès et de sa région est fortement ressenti au niveau des installations de potabilisation.

Parallèlement à l'augmentation des quantités des déchets organiques, au cours des dernières décennies, le recours à des sources d'énergie renouvelables reçoit un considérable intérêt dans le monde entier. L'énergie de biomasse est l'une des sources prometteuses qui valorise les déchets organiques : les eaux usées, les résidus agricoles et industriels qui peuvent être utilisés pour produire du bio-carburant. La biomasse peut être convertie à l'état liquide biologiquement et donner des produits tels que l'éthanol, le méthanol, le méthane et l'hydrogène par des processus de fermentation (Haagensen et al., 2009). L'éthanol a suscité un intérêt particulier en tant que combustible liquide alternatif pour le transport. Il est d'une immense importance pour les pays dont l'approvisionnement énergétique dépend fortement des importations du pétrole brut causant ainsi une facture annuelle assez lourde. Aujourd'hui le bioéthanol provient de la biomasse constitué par l'amidon et la canne à sucre, ce qui implique la compétition avec l'alimentation humaine et animale (Patni et al., 2013).

Dans ce sens, il est essentiel de choisir la voie de traitement et de valorisation des margines et du lactosérum la plus pertinente pour limiter leur pollution et produire la valeur

ajoutée. Ainsi, notre étude est consacrée à la synthèse de bioénergie à partir de ces déchets par des souches de levures thermophiles caractérisées par une grande capacité de production de l'éthanol et une forte performance dans la dépollution de ces effluents industriels.

Objectifs :

- Production de bioéthanol à partir des margines et du lactosérum.
- Dépollution des margines par la réduction de la charge organique (DBO5 et DCO).
- Optimisation du rendement de la production du bioéthanol et dégradation des polyphénols.
- Etude de la cinétique de production de bioéthanol par la souche performante sur les margines.
- Comparaison de la production de l'éthanol et de la masse cellulaire sur les margines et le lactosérum.

Partie I : Revue Bibliographique

A) Margines

I) Caractérisation physico-chimique des margines

1. Procédés de production de l'huile d'olive et les sous-produits associés

Au Maroc et jusqu'à ces dernières décennies, le secteur oléicole n'utilisait que des techniques traditionnelles. L'extraction a été réalisée à l'aide des systèmes archaïques de pression faisant appel à la force animale à défaut de l'énergie électrique. Avec le développement du secteur oléicole, les systèmes traditionnels ont cédé la place aux équipements modernes. Auparavant, l'extraction était effectuée de manière discontinue. De même, après le développement des appareils de centrifugation, la séparation de l'huile des eaux de végétation est devenue moins coûteuse (Francesco, 1993).

a. Procédés en discontinu ou système à presse

Ce sont les systèmes classiques par pression avec broyeurs. Le broyage des olives suivi du malaxage se font sous des meules. Une pâte est obtenue au bout d'une demi-heure environ. elle est composée de grignon et un moût contenant l'huile et les margines. La séparation des deux phases solide-liquide se fait par simple pression, alors que l'huile est séparée des margines par décantation naturelle, le procédé est schématisé dans la **figure 1**.

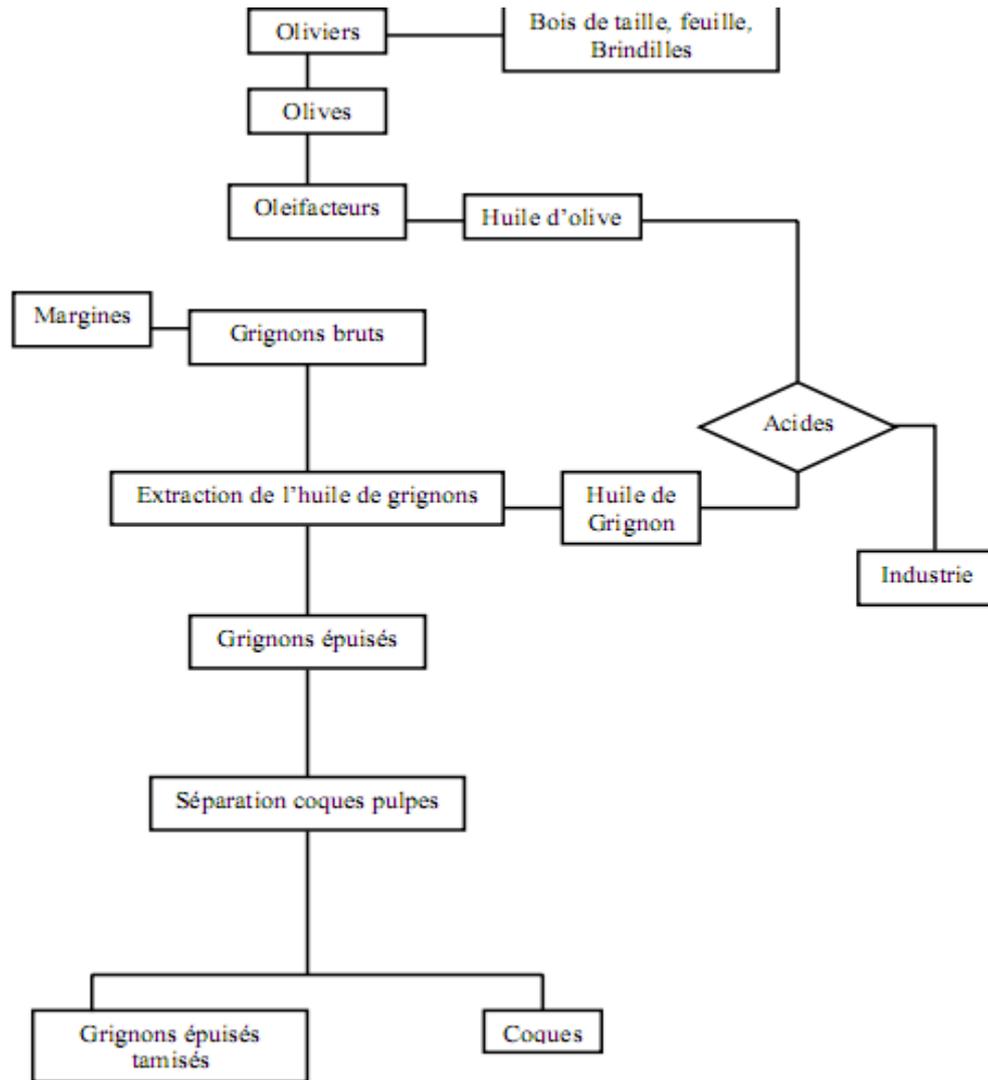


Figure 1: Diagramme de traitement des olives par pression (Nefzaoui, 1987).

b. Procédés en continu ou système à centrifugation

L'extraction d'huile d'olive se fait à travers des phases successives contrairement au procédé discontinu. Les olives sont lavées, broyées, mélangées avec l'eau chaude et malaxées. Les phases liquides et solides sont séparées par centrifugation. Le moût subit à son tour une centrifugation pour séparer l'huile des margines, le procédé est schématisé dans la **figure 2**.

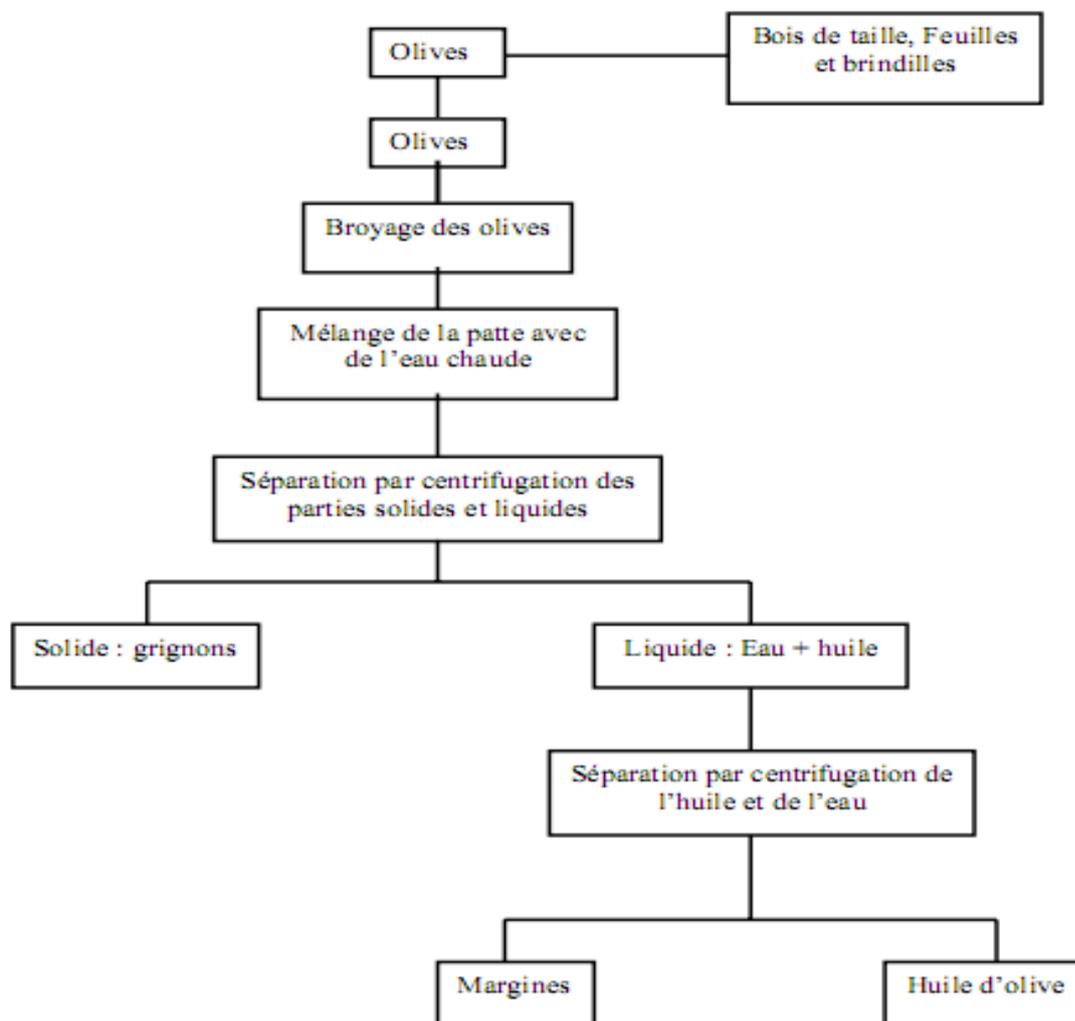


Figure 2: Procédé d'obtention de l'huile d'olive par le système continue (Nefzaoui, 1987).

Certains auteurs rapportent que la DCO des margines provenant d'un procédé d'extraction par centrifugation varie entre 20 et 200 g d'O₂/l de margines (Di-Giovacchino et al, 1988 ; Martin et al, 1991 ; Hamdi, 1993). Celle des margines produites par les systèmes d'extraction par pression varie entre 100 et 390 g d'O₂/l de margines (Di-Giovacchino et al, 1988 ; Mouncif et al, 1993).

2. Propriétés physico-chimiques

Les margines présentent une couleur rose-brune intense ou noire due au polyphénols, avec une forte odeur d'olive, un aspect trouble, un peu visqueux et un pH de 4 à 6, Leur composition a été bien étudiée par les chercheurs et comporte approximativement 90 % d'eau, 7 à 15 % de matières organiques et 1 à 2 % de substances minérales (Fiestas Ros de Ursinos, 1981).

a. Fraction organique des margines

La composition organique des margines varie en fonction du stade de maturation des olives, du processus d'extraction, des conditions climatiques et de la variété de l'olivier+. La DCO et la DB05 peuvent respectivement dépasser les 100 et 200 g/l (Balice et al.1982). Il contient des polyphénols de haut poids moléculaire, comme l'anthocyane et tanins dont la concentration atteint 12g/l (Balice et al.1982), et des acides organiques comme acide fumarique, lactique et glycérique, en plus des lipides, des glucides et des vitamines principalement les vitamines B, et tous les acides aminés. Les plus abondants sont les acides aspartique et glutamique et la glycine (Salvemini, 1985).

Ces rejets sont aussi caractérisés par la prédominance de substances toxiques notamment les composés phénoliques (9.7 g/l) (Ranalli, 1991a, Capasso et al., 1995 ; Capasso, 1997). Ces derniers sont divisés en plusieurs classes qui dépendent des caractéristiques structurales de leur squelette carboné, ils contiennent des acides phénolique et aldéhyde, flavonoïdes, tannins et lignines (Shahidi et al., 2003), Les différents pourcentages des composés phénoliques sont portés dans le **tableau 1**.

Tableau 1: Concentration des composés phénoliques dans les margines

Composés phénoliques	Pourcentage (%)	Références
Acides phénoliques		Lesage et al., 2001
Acide coumarique	0.021	
Acide caféique	0.0072	
Acide vanillique	0.017	
Tyrosol	0.014	Capasso et al., 1992
Hédroxytyrosol	0.002	
Flavonoïdes		
Lutéoléine	0.014	Vinha et al., 2005.
Luteolin 7-O-glucoside	0.021	

b. Fraction minérale des margines

La fraction minérale des eaux de végétation a été complètement analysée par (Salve mini, 1985) et rapportée dans le **tableau 2**.

Tableau 2: Composition minérale des margines

Elément chimique	Concentration (mg/l)
Phosphore (PO ₄ ²⁻)	800.6
Chlore (Cl)	270.2
Sulfate (SO ²⁻)	16.68
Sodium	5370.9
Potassium	15295.5
Calcium	1167.6
Magnésium	410.3

3. Caractérisation microbiologique des margines

Les substances phénoliques contenues dans les margines sont potentiellement toxiques et inhibent le développement des microorganismes en présence ou en absence d'oxygène. Des chercheurs ont identifiés un certain nombre de flavonoïdes, de phénols et des glucosides phénoliques qui ont la propriété d'inhiber le développement de certaines bactéries dont les lactobacilles et les champignons. D'autres substances, tels que les acides gras et leurs dérivés inhibent les bactéries sporulés du sol. Toutefois, plusieurs microorganismes se développent sur les margines et les utilisent comme source de carbone (Vazquez et al. 1970).

II) Impact des margines sur l'environnement

Les margines, effluents d'extraction de l'huile d'olive, posent de sérieux problèmes de pollution par leur concentration élevée en matières organiques et en poly phénols. Des études de toxicité et de biodégradabilité ont montré que les composés phénoliques qui sont de nature humiques, sont responsables de la coloration noire très peu toxiques et difficilement biodégradables par contre, les composés tanniques sont très toxiques mais biodégradables.

En effet, le rejet des margines reste jusqu'à présent un problème écologique prépondérant Ainsi qu'un redoutable souci pour les pays producteurs d'huile d'olive où de

larges volumes sont produits dans des intervalles de temps très brefs s'étendant de Novembre jusqu'à Avril. L'absence de méthodes de traitement adaptées pousse les propriétaires d'huileries à rejeter ces eaux dans la nature sans aucun contrôle (Fiorentino et al., 2003).

1. Pollution des eaux

Les margines sont rejetées le plus souvent dans des récepteurs naturels, des cours d'eau, sans aucun contrôle préalable et nuisent fortement à la qualité de ces eaux de surfaces; la très forte charge en matières organiques empêche ces eaux de s'auto-épurer et la pollution peut s'étendre sur de très longues distances (Mébirouk et al., 2002).

La coloration des eaux naturelles due aux tannins est l'un des effets les plus visibles de la pollution. De plus, la teneur élevée en sucres réducteurs provoque la prolifération des micro-organismes qui y profitent comme substrat, ceci diminue la disponibilité de l'oxygène dans l'écosystème aquatique, de même que l'accumulation du phosphore provoque l'eutrophisation des eaux (Lacomelli, 2000).

En outre, l'épandage des margines, très riches en éléments azotés, peut causer la pollution des nappes souterraines situées dans la zone ou à proximité du site d'épandage et souiller la qualité de l'eau potable ; or dans le bassin méditerranéen, les ressources en eau sont rares et leur préservation, tant que quantitativement que qualitativement est capitale. Ensuite, Les lipides présents dans les margines forment un film imperméable à la surface des rivières et ses bords empêchent la pénétration de la lumière et l'oxygène (Benyahia et Zein, 2003).

2. Pollution des sols

Les composés phénoliques, les acides organiques, le pigment et la haute salinité (conductivité élevée) peuvent causer des effets phytotoxiques sur les oliviers (F.A.O, 1983). Ils provoquent une diminution de la matière sèche en diminuant la disponibilité de l'azote, en plus de leur toxicité pour certains micro-organismes. Les acides, les éléments minéraux et les substances organiques aboutissent à une destruction de la capacité d'échange cationique du sol (CEC), par la suite, une augmentation de la stérilité du sol. qui augmente suite à l'action altérante des acides, des minéraux et des composés organiques (Filidei et al., 2003).

La forte acidité des margines a un impact négatif sur le sol et ses constituants. La microflore Bactérienne du sol peut être détruite suite à l'acidification du milieu. Par ailleurs le caractère visqueux des margines entraîne la formation d'un dépôt huileux qui provoque L'imperméabilisation du sol dans un premier lieu et son asphyxie par la suite (Cadillon 1991).

3. Pollution d'air et du paysage

Les fortes teneurs en sels des eaux de végétation, leur forte charge et leur acidité sursaturent le milieu récepteur et provoquent des conditions d'anaérobioses propices aux dégagements d'odeurs désagréables liées à la formation d'acide H_2S lors du processus de fermentation. Les odeurs encombrant fortement les bordiers du cours d'eau (Manahan, 1994).

III) Traitement des margines

Jusqu'à maintenant, le traitement des margines constitue un problème complexe vue la qualité et la quantité des substances chimiques qu'elles renferment. Donc, l'application d'un traitement simple s'avère insuffisant (Ranalli, 1991a ; Hamdi, 1993a). Plusieurs systèmes d'épuration des margines sont cités dans la littérature. Les procédés de traitement dont nous avons pris connaissance sont multiples. Toutefois, les procédés de traitement envisageables pour l'élimination de la charge polluante des margines peuvent être classés selon trois catégories : procédés physiques, procédés chimiques, procédés biologiques. Le choix du système de traitement approprié est lié à plusieurs facteurs locaux, à savoir le système utilisé pour l'extraction d'huile, la possibilité de stockage et le rapport entre la charge produite par les huileries et la population locale (Francesco, 1993).

1. Procédés physiques

Les méthodes de traitement physique des margines restent des opérations de séparation de matières minérales et organiques solubles et insolubles de leur phase aqueuse.

1.1 Processus thermiques

1. 1. 1 Distillation

La technique adoptée est la distillation étagée avec une circulation naturelle pour les deux premiers étages et une circulation forcée pour le troisième. Le taux de dégradation pour les trois étages est de 90% de DCO. Cependant, le distillat est d'une DCO de 10 g d' O_2 /l et le condensât contient des concentrations appréciables en composés volatiles. Par conséquent, un traitement complémentaire est nécessaire au distillat avant son rejet ou sa réutilisation en irrigation (ONAS en 1977).

1.1.2 Incinération

Ce procédé permet d'évaporer au début la phase aqueuse des margines et de brûler ensuite les matières organiques. Ces dernières forment le pouvoir calorifique et cèdent ainsi la chaleur nécessaire à l'incinération. Les margines sont introduites dans un four où elles seront évaporées et le résidu solide sera transformé en cendres avec production de chaleur. L'énergie nécessaire au système est obtenue par combustion de grignon (Ranalli, 1991b). Un système d'incinération a été conçu en 1981 en Italie impliquant la construction d'une usine modulaire pour traiter les margines (Baccioni, 1981). Celles-ci subissent une centrifugation, puis une incinération par des échanges thermiques à haute température s'élevant jusqu'à 750-850°C.

1.2 Techniques membranaires

Les margines peuvent être aussi traitées par des méthodes membranaires. Ces processus se basent sur l'utilisation de membranes de filtration qui permettent la séparation des substances dissoutes selon la taille des particules.

1.2.1 Ultrafiltration

Ce procédé repose sur la filtration à travers une membrane permettant la rétention des macromolécules de masse moléculaire supérieure à 500 g/mol. La séparation se fait sous l'effet d'un gradient de pression de 3 à 10 bars. C'est une technique qui est actuellement appliquée à l'échelle industrielle pour le traitement des eaux de végétation. Les tests d'ultrafiltration ont donné un liquide limpide (Reimers, 1983 ; Renzo et Amirante, 1988 ; Ranalli, 1991a).

1.2.2 Osmose inverse

L'osmose inverse permet de séparer une solution en deux phases : l'une concentrée et l'autre diluée sous une pression allant jusqu'à 80 bar. Des essais de traitement des margines ont été réalisés par cette technique (Reimers, 1983 ; Renzo et Amirante, 1988), les margines obtenues étaient incolores (Ranalli, 1991a).

Bien que le problème de traitement des margines soit partiellement résolu par les procédés physiques, certains inconvénients peuvent limiter leur utilisation; notamment l'apparition d'une forte pollution solide à la fin de cette opération et le coût élevé des installations.

2. Procédés chimiques

Le traitement chimique des margines est appliqué afin de réduire l'intensité de leur coloration (Chamrani, 1994 ; Balice et al, 1997). Il peut être utilisé en tant que traitement préliminaire ou traitement de finition après épuration biologique. Ces techniques sont basées généralement sur les phénomènes de coagulation-floculation ou d'adsorption.

2.1 Coagulation-floculation

La coagulation est parmi les méthodes les plus efficaces pour éliminer les matières organiques en suspension et colloïdales. Elle consiste à traiter les margines avec des produits tensioactifs ou certains coagulants. Ce traitement est certainement le moins coûteux (Castillo-Rivera, 1999). Fiestas Ros de Ursinos (1958) a obtenu des réductions de 35% et de 31% de la matière organique en utilisant respectivement des sels de fer et des sels d'aluminium. La coagulation par la chaux a donné une réduction de la DCO de 40 à 50% (Mendia et Procino, 1964 ; Beccari et al., 1999).

Ce processus peut être utilisé après traitement biologique pour éliminer les matières en suspension et les polluants résiduels (Fiestas Ros de Ursinos et Borja, 1992). L'inconvénient majeur de ce traitement réside dans le fait qu'on a un simple transfert de la pollution de l'état soluble à l'état boueux. En plus, la plupart des composés organiques contenus dans les margines sont difficiles à précipiter.

2.2 Adsorption

L'adsorbant le plus utilisé pour éliminer les polluants organiques des eaux résiduaires est le charbon actif. Cependant, il est non seulement une matière relativement chère, mais après saturation, le coût de régénération pour sa réutilisation est élevé. Encore l'adsorption sur charbon actif est généralement limitée pour l'élimination des substances non polaires (Diamadopoulos et al., 1992). Ainsi, d'autres adsorbants organiques et inorganiques de substitution ont été étudiés ces dernières années (Beccari et al., 1999) ont montré que le prétraitement des margines par adsorption sur bentonites permet d'obtenir une bonne réduction de la DCO allant jusqu'à 61,6% à pH 6,5. (Oukili et al., 2001) ont utilisé aussi ce processus d'adsorption sur des argiles de Fès. Ils ont remarqué après optimisation du système un taux d'abattement de la DCO de l'ordre de 86%.

Ce même procédé a été réalisé par (Al-Malah et al., 2000), les pourcentages d'élimination des polyphénols et de la DCO sont de l'ordre 81% et 71% respectivement. La réalisation de ce procédé à grande échelle rencontre plusieurs difficultés, vu l'importance de la quantité d'argiles utilisée. Vue la forte charge organique contenue dans les margines, ces procédés chimiques nécessitent l'ajout de grandes quantités de réactifs. Ce qui pose le problème de la production des boues putrescibles et du coût élevé des réactifs sans valeurs ajoutées qui va compenser les charges de traitement.

3. Procédés biologiques

La bio-dépollution définie comme étant la décomposition de la matière par le biais d'un agent biologique en particulier, les micro-organismes. Ces derniers jouent un rôle très important dans le processus de dépollution et permettent la réduction de la toxicité des éléments polluants engendrés par l'activité naturelle ou humaine (Ranalli, 1991a). La dégradation biologique à l'opposé des procédés physico-chimiques est considérée comme une méthode plus saine, efficace et moins coûteuse pour la réduction des polluants (Hamdi, 1993a ; Hamdi, 1993c). Plusieurs procédés déjà étudiés dans ce cadre à titre d'exemples :

3.1. Traitement anaérobie des margines

La fermentation anaérobie peut être utilisée comme un moyen de traitement et de valorisation des margines en bioénergie (Ergüder et al.,2000; Fountoulakis et al., 2002). En effet, la digestion anaérobie des margines offre des avantages significatifs en matière de réduction de la consommation d'énergie et de la production de boues de qualité agronomique. De plus, elle a révélé des performances élevées en comparaison avec le traitement anaérobie des autres rejets industriels agroalimentaires (Anderson et al., 1977). Parmi les avantages de ce type de traitement :

- les bactéries anaérobies ont la capacité de transformer en méthane la plupart des substances organiques présentes.
- la demande de nutriments est faible.
- les mauvaises odeurs ne sont pas émises.

La digestion anaérobie permet une réduction de la DCO de l'ordre de 70% à 85%. Son rendement est proportionnel à la concentration des micro-organismes (Martin et al., 1991). (Di Gioia et al. 2001b) ont montré que la co-culture des deux bactéries *Ralstonia sp* et *Pseudomonas putida* en anaérobiose a permis la dégradation de 7 parmi 9 composés

aromatiques monocycliques présents dans les margines. Le problème majeur rencontré lors du traitement anaérobie des margines par la majorité des chercheurs est le démarrage de leurs digesteurs. En effet, la stabilité de ces derniers est très longue si les margines sont très concentrées. Le traitement anaérobie des margines comprend plusieurs procédés, à titre d'exemple :

3.1. 1. Digesteur

Ce procédé est défini comme les boues activées anaérobies. Elles ont été étudiées par plusieurs auteurs (Antomacci et al., 1981 ; Fiestas Ros de Ursinos et al., 1982 ; Aveni, 1984). Un abattement important de la matière organique (80-85% de DCO) a été achevé lors du traitement des margines dans une installation pilote pour un temps de séjour de 20-25 jours (Martin et al., 1991). La production de méthane a été de 60-70% en terme de rendement. L'efficacité de ce système est variable.

3.1. 2. Lit de boues à flux ascendant

Ce processus a été développé pour la première fois en Hollande (Lettinga et al., 1980). Puisque la pollution contenue dans les margines est principalement soluble et colloïdale (90%), ce procédé a donné de meilleurs résultats par rapport aux autres procédés anaérobies (Boari et al., 1984). Le problème principal rencontré était la formation de mousse liée à la surcharge organique des margines pendant le démarrage. Ce problème a été résolu par dilution de margines et augmentation de la teneur en azote (DCO/N de 170/1).

L'inconvénient de traitement anaérobie, reste toujours non satisfaisant, puisque une fraction considérable de composés phénoliques persiste dans l'effluent traité (Borja et al., 1995b ; Beccari et al., 1996, 1998). Cette digestion anaérobie peut être inhibée par les acides gras à chaîne longue, notamment l'acide oléique (Koster et Cramer, 1980). De même, à partir d'une concentration de 100 mg /l d'acide phénolique dans les margines, les bactéries méthanogènes sont inhibées (Hamdi et al., 1991b).

3.2 Traitement aérobie des margines

Des études ont été réalisées sur le traitement aérobie des margines, par des cultures pures de micro-organismes *Aspergillus terreus* et *Pleurotus ostreatus* (Garrido Hoyos et al., 2002 ; Fountoulakis et al., 2002). Les tests de toxicité réalisés sur la germination de quelques plantes ont montré une diminution de la toxicité des margines traitées par ces micro-organismes

(Hamdi et al., 1993b ; Martirani et al., 1996 ; Ehaliotis et al., 1999 ; Kissi et al., 2001). D'autres travaux ont prouvé l'efficacité du traitement aérobie par des cultures mixtes. Une dégradation considérable de deux composés phénoliques les plus représentatifs dans les margines (tyrosol et l'acide caféique) a été obtenue en utilisant les micro-organismes isolés des margines (Borja et al., 1995c).

(Sayadi et Ellouz 1992, 1993, 1995) ont étudié la possibilité de traiter les margines en aérobie avec des champignons. Comme les margines présentent un déficit notamment en matière azotée, ces auteurs ont procédé à l'ajout des nutriments.), cette étude a révélé que l'ajout du veratryl alcool induit l'activation du système ligninolytique qui joue un rôle principal dans la dégradation des composés phénoliques des margines. Par conséquent, ils ont obtenu environ 74% de décoloration des margines. (Zouari et Ellouz, 1996). Robles et al. (2000) ont isolé à partir des margines des souches de *Penicillium sp* capables de dégrader les polyphénols et de produire la biomasse à partir des margines brutes (DCO : 120 g d'O₂.l⁻¹). Les résultats enregistrent un taux de réduction de la DCO qui se situe entre 61,82% et 74,75%.

D'un autre côté la Co-culture des souches de bactéries a révélé leur capacité de dégrader en conditions aérobies les composés aromatiques monocycliques présents dans les margines (Di Gioia et al., 2001a ; Bertin et al., 2001). Au Maroc, le traitement aérobie des margines à pH neutre par les micro-organismes du sol a permis d'éliminer 70% des composés phénoliques et de réduire 63% de la DCO initiale.

L'inconvénient dominant du traitement aérobie est la consommation excessive d'oxygène. En général, le traitement des margines par l'application seule des procédés biologiques a donné des résultats insuffisants (Ranalli, 1991a). Ceci est dû en grande partie à la présence de fortes charges organiques polluantes représentées particulièrement par les composés phénoliques. Ces composés constituent des inhibiteurs de la flore microbienne responsable de la biodégradation (Borja et al., 1994a ; Beccari et al., 1996 ; Yesilada et Sam, 1998). Le traitement biologique des margines en plusieurs étapes s'avère nécessaire pour obtenir un meilleur rendement épuratoire (Ranalli, 1991a, 1992 ; Hamdi, 1993a)

IV) Voies de valorisation des margines

Pour pouvoir être recyclés et /ou valorisés, les « déchets » organiques ne doivent plus être considérés comme des résidus dont il faut se débarrasser mais comme des matières premières qui peuvent présenter un intérêt soit agronomique (fertilisation, apport de matière organique...), soit matière (alimentaire ou industriel), soit énergétique. Par ailleurs beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'élimination des polyphénols dans les margines, car ils sont plus toxiques, par des approches physico-chimiques (Khoufi et al, 2006) ou par dégradation biologique (D'Annibale et al, 2004).

D'autre part, les polyphénols naturels se sont avérés avoir une large application dans la santé humaine et la conservation des aliments (De Leonardis et al, 2007; Soni et al. 2006.) Ainsi, la fraction phénolique des margines représente une stratégie économiquement intéressante, surtout si les solvants alimentaires compatibles sont employés dans l'extraction du produit (Bertin et al, 2011; Ferri et al, 2011). En effet, l'exploitation des margines peut également être adressée vers la production de produits chimiques d'origine biologique à valeur ajoutée. Par exemple, la production de bio polymère tel que polyhydroxycanoate. Voici quelques exemples concrets de valorisation de ce déchet par la voie de la biotechnologie et la physico- chimie:

1. Utilisation des margines comme fertilisant

Les margines peuvent être utilisées comme engrais en apportent 3,5 à 11 kg de potasse, 0,6 à 2 kg d'acide phosphorique et 0,15 à 0,5 kg de Manganèse par m³. Les essais réalisés permettent de fixer certaines précautions à savoir :

* Ne pas dépasser la dose de 30 m³/ha/an.

* Arroser toujours entre les arbres.

* Pour les cultures annuelles, arroser au moins 1 mois avant la récolte, pour éviter les effets phytotoxiques et ne jamais arroser pendant la période de végétation (Fiestas Ros de Ursinos, 1986).

2. Protéines d'organismes unicellulaires (POU)

Les cultures de levures en fermenteurs aérés sur les margines produisent des protéines d'organismes unicellulaires qui peuvent être employées pour l'alimentation animale. Les principaux travaux de production de levures-aliments à partir des margines sont reportés dans le **tableau 3**.

Tableau 3: Utilisation des levures pour la production de POU

Souche	Biomasse en g/l	Références
<i>Candida utilis</i>	13	Fiestas Ros de Ursinos et al., 1981
<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	18-26	Ercoli et Ertola., 1983
<i>Candida Tropicalis</i>	20-26	Giulietti et al., 1984

3. Méthanisation des margines

Les différents groupes bactériens impliqués dans le processus de méthanisation en présence des acides phénoliques des margines, ont montré que pour faciliter le démarrage de la méthanisation des margines, le nombre de bactéries méthanogènes devrait être très supérieur à celui des bactéries acidogènes. Ces problèmes d'acidification et d'inhibition peuvent être surmontés, en diluant les margines de façon à obtenir une activité lente des bactéries acidogènes. Cependant la dilution des margines n'est pas toujours envisageable en raison du manque d'eau; dans certains cas, elle diminue également la capacité volumique des digesteurs. Avec ces problèmes d'acidification et de toxicité, la méthanisation des margines se heurte également au problème de la biodégradation des composés aromatiques simples et complexes.

Cependant, le problème rencontré par tous les auteurs a été le démarrage de leurs digesteurs. La stabilisation des digesteurs est très longue si les margines sont concentrées. De plus, durant le démarrage, quand on ajoute la margine, l'acidification par les microorganismes augmente rapidement et la méthanisation est inhibée à la fois par l'acidité et par les composés phénoliques. Ces mêmes auteurs ont noté que les problèmes de démarrage pouvaient être résolus en diluant les margines et en ajoutant de l'urée (Boari *et al.*, 1984).

4. Production des enzymes

La production industrielle des enzymes est possible par les levures et champignons filamenteux en utilisant les margines. Les principaux enzymes obtenus à travers le traitement par ces microorganismes sont lipases, laccases, peroxydases et pectinases sont produits à partir des margines inoculés par *Cryptococcus albidus* mais des lipases ont été obtenues à partir de souche *Yarrowia lipolytica* (Goncalves et al 2010).

5. Effet antioxydant des margines

Si les margines sont proprement gérées, elles seront moins chères et une source pertinente des antioxydants naturels (Niaounakis and Halvadakis, 2006) à cause de leur teneur élevée en substances phénoliques, les polyphénols sont des composés organiques solubles dans l'eau et ils sont abondants dans les margines (Obied et al, 2007). Plus de quarante molécules phénoliques ont été identifiées dans les eaux de végétation, avec l'hydroxytyrosol qui est la principale molécule phénolique vue à sa forte capacité antioxydant (Tsimidou et al., 1992).

En générale tous les composants phénoliques possèdent un effet antioxydant, leur action est l'élimination des radicaux libres dans les cellules, ce qui leur permet la protection contre l'oxydation à cause du stress appliqué sur les biomolécules comme les protéines, lipides et l'ADN (Boskou, 2006). En plus comme des substances naturelles possédant un grand potentiel antioxydant, elles présentent un bon prix de commerce, et leur vraie demande est dans la cosmétique, la pharmacie et l'industrie des aliments. D'autre part, si les polyphénols sont laissés sans aucun traitement, les margines seront graduellement oxydés et/ou polymériser rendant les eaux de végétation plus toxiques (Chatzisyneon et al., 2009b ; Celano et al., 2008; Martirani et al., 1996).

V) Bioéthanol de deuxième génération

1. Production d'éthanol à partir la matière lignocellulosique via la voie biochimique

La conversion biochimique des matériaux lignocellulosiques grâce à la saccharification et la fermentation est une voie majeure pour la production de bioéthanol. La transformation de la matière lignocellulosique en bioéthanol est difficile en raison de la nature résistante de la biomasse; les variétés de sucres qui sont libérés lorsque les polymères de cellulose et d'hémicellulose sont rompues et la nécessité des organismes performants ou génétiquement modifiés, les coûts de collecte et de stockage de la biomasse, mais le bioéthanol de deuxième génération ne présente pas une compétition avec l'alimentation humain contrairement au bioéthanol de première génération (Taherzadeh et al., 2008). **La figure 3** récapitule le processus de conversion de lignocellulose en éthanol.

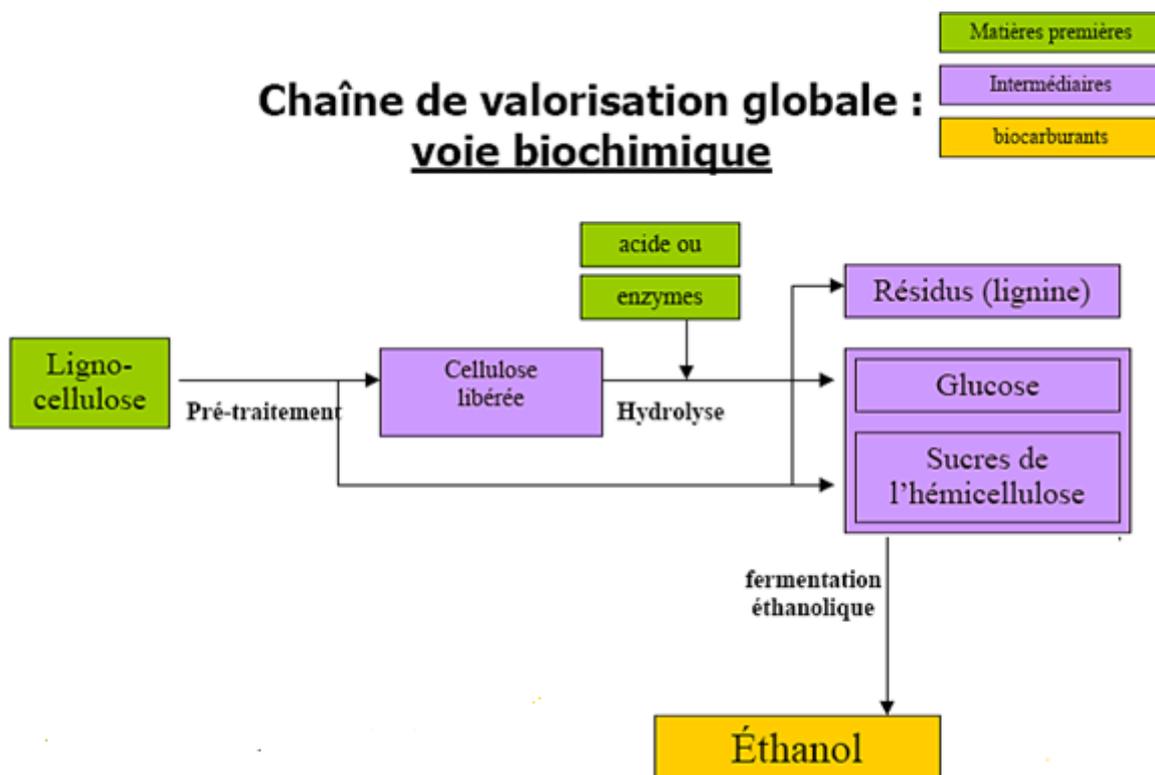


Figure 3: Voie générale de la production de bioéthanol à partir la matière lignocellulosique (Ogier et al, 1999)

2. Effet de l'éthanol sur la cellule de levure

L'éthanol produit au cours d'une fermentation inhibe la croissance des levures et sa propre production. La croissance commence à être inhibée à partir de 20-40 g/l, pour une inhibition complète à partir 70 à 100 g/l (Casey & Ingledew, 1986), alors que la production d'éthanol peut se poursuivre jusqu'à 150 g/l (Alfenore et al., 2004). Différents paramètres de conduite de la fermentation peuvent influencer la tolérance à l'éthanol. Le plus important est sans doute la température, qui accentue l'effet inhibiteur de l'éthanol (Gao & Fleet, 1988). Une diminution du rendement de production d'éthanol, accompagnée d'une augmentation de la production de glycérol et d'une chute accélérée de la viabilité cellulaire sont observées lorsque la température de culture est supérieure à 35°C (Aldiguier et al., 2004).

L'aération pourrait également avoir un rôle plus ou moins direct. Une aération importante (pression partielle en oxygène dissous pO_2 supérieure à 20 %) au lieu d'une micro-aération (apport d'air dans l'espace de tête du fermenteur) permet d'augmenter la teneur finale en éthanol de 131 à 147 g/l (Alfenore et al., 2004). L'aération a également une influence sur la pression partielle en CO_2 (pCO_2) dans le milieu de culture : plus la pO_2 est importante, plus la pCO_2 est faible. Le CO_2 étant reconnu comme un important inhibiteur de la croissance chez *S. cerevisiae* (Dixon & Kell, 1989), l'aération pourrait limiter son effet sur les cellules.

Enfin, un apport optimisé de vitamines permet la croissance et la tolérance à l'éthanol. Alfenore et al. (2002) ont montré qu'un apport des vitamines à chaque doublement de population (au lieu d'un seul apport en début de culture) permettait la croissance jusqu'à 115 g/l d'éthanol (au lieu de 100 g/l) et la poursuite de l'activité fermentaire jusqu'à 147 g/l d'éthanol (au lieu de 126 g/l). Ces améliorations sont attribuables à un meilleur maintien de la viabilité cellulaire.

L'éthanol est connu pour être un inhibiteur de la glycolyse. Des études in vitro ont montré par exemple que les activités de la phosphoglycérate kinase, la phosphoglycérate mutase et la pyruvate décarboxylase étaient inhibées par l'éthanol (Millar et al., 1982). L'éthanol agit également en s'intercalant dans les membranes et l'augmentation de la fluidité membranaire qui en résulte augmente la perméabilité de la membrane aux protons et à d'autres composés (Salgueiro et al., 1988), et perturbe le fonctionnement des enzymes membranaires, notamment des transporteurs et de l'ATPase (Alexandre et al., 1994).

La présence d'éthanol affecte ainsi l'assimilation de certains composés comme le glucose (Leáo & van Uden, 1982), certains acides aminés (Leáo & van Uden, 1984). En réponse à l'effet fluidifiant de l'éthanol, une modification de la composition de la membrane plasmique permet à la cellule de moduler la fluidité membranaire (Swan & Watson, 1999). Ainsi, la présence d'acide oléique (You et al., 2003) permettrait d'améliorer la tolérance à l'éthanol .

Par ailleurs, l'éthanol a pour effet d'abaisser de manière importante l'activité de l'eau, à un niveau tel que cela déstabilise la structure des membranes, affecte le fonctionnement des enzymes et modifie la configuration de l'ADN (Hallsworth, 1998). Se substitue l'eau, l'éthanol perturbe les liaisons hydrogène qui interviennent dans la stabilisation de nombreuses structures cellulaires. Le tréhalose joue un rôle important dans la tolérance à l'éthanol, selon un mécanisme similaire à celui qui lui permet de stabiliser les membranes et les protéines lors de la déshydratation (Leslie et al., 1995)

B. Lactosérum

I) Caractérisation physico-chimique du lactosérum

1. Procédé de production de petit lait

La fabrication du fromage peut être décomposée en quatre grandes étapes présentées dans la **figure 4** :

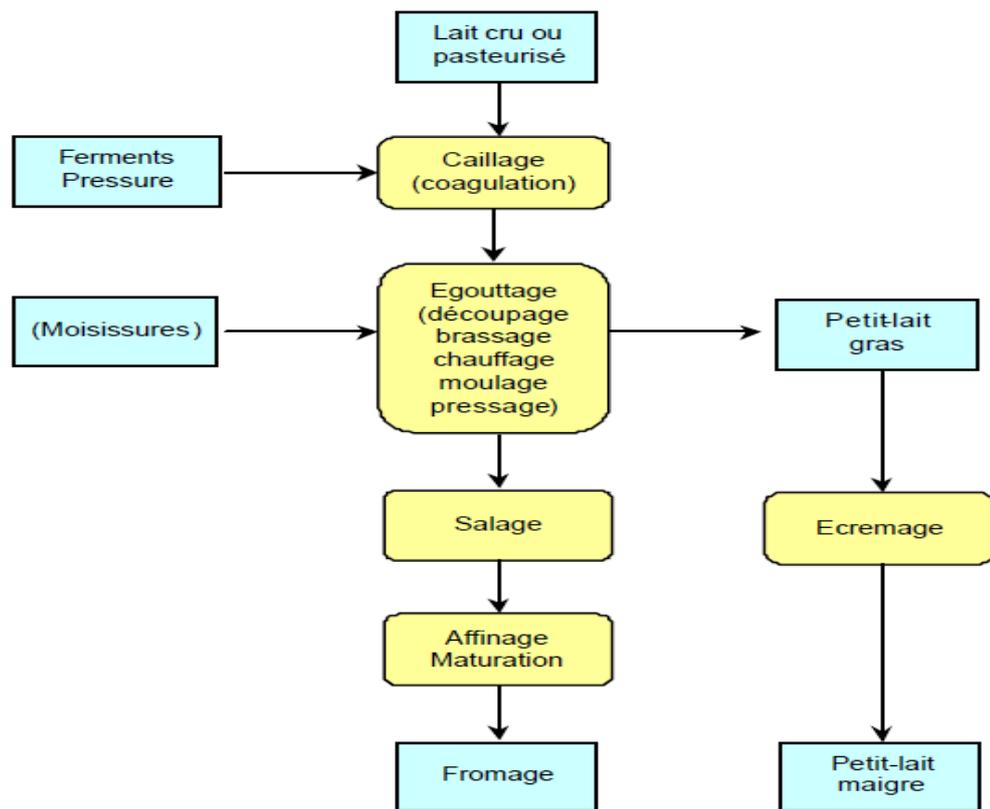
-Le caillage ou coagulation : sous l'action de ferments (bactéries) ou de pressure (enzymes) les protéines du lait coagulent pour former le caillé. La majeure partie des protéines et des graisses du lait sont retenues dans le caillé

-L'égouttage : on retire l'excédent liquide du caillé : on obtient le lactosérum ou petit-lait, qui contient encore des matières grasses. Le caillé est finalement moulé.

-Le salage : le salage favorise la bonne conservation du fromage et accélère le séchage et la formation de la croûte.

-L'affinage ou maturation : la pâte se transforme sous l'action de la flore bactérienne, il s'effectue à une température et une humidité optimale selon le type de fromage.

Il faut environ 11 kg de lait pour faire 1 kg de fromage sec. Il reste donc 10 kg de petit-lait. **Le schéma 4** présente le procédé de production de fromage (Onwulata et al 2008).



2. Type et composition du Lactosérum

Figure 4: Procédé de production de fromage et petit lait (Office Fédéral de l'énergie France, rapport 2004)

Le lactosérum défini comme étant la partie liquide restant après la séparation de la caille qui résulte de la coagulation acide ou enzymatique du lait. Il représente environ (85-95%) du volume de lait et impose une forte demande biochimique en oxygène (DBO) de 20-50 g/l et une demande chimique en oxygène (DCO) de 60-80 g/l. Le type et la composition du lactosérum dépend de la technique du traitement dans les usines laitières (Siso et al., 1996). Les constituants du petit lait sont reportés dans le **tableau 4**.

Tableau 4: Composition du lactosérum doux et acide (BURGAUD 1969).

Composition	Lactosérum doux	Lactosérum acide
Liquide %	93.5	94
Extrait sec %	6.5	6
Lactose (g/l)	76	74
Protéines (g/l)	13.5	12
Cendres (g/l)	8	12
Acide lactique (g/l)	1.8	1.8
Matière grasse (g/l)	1	0.5
Ca%	0.6	1.8
P %	0.6	1.5
NaCl %	2.5	7.5

Les principaux composants du lactosérum doux ou acide, après l'eau vient le lactose (environ 70-72% des solides totaux), les protéines (environ 8-10%) et les minéraux (environ 12-15%) (**Tableau 4**). Le pH du lactosérum est variable selon sa provenance et le procédé de transformation. Pour le petit lait doux le pH= 6.70, concernant le lactosérum acide le pH= 4.60, la viscosité de ces liquides est moyenne (Pesta et al., 2007)

II) Voies de la valorisation du Lactosérum

1. Production des protéines et du poudre de lait

Le souci des gestionnaires industriels d'améliorer la rentabilité des entreprises et de diminuer la charge organique des eaux usées a entraîné un changement de perception vis-à-vis de ces sous-produits. Depuis 1965, on retrouve des séchoirs à lactosérum dans les plus grandes fromageries et depuis 1984 on s'intéresse à la concentration de ses protéines. La valorisation des protéines du lactosérum pose en revanche un autre problème : le perméat produit par ultrafiltration est en fait une solution composée de lactose avec des sels minéraux, de l'acide lactique, des composés azotés et des vitamines (De Haast *et al.*, 1985,).

Ce produit a actuellement des débouchés commerciaux limités. Les procédés d'extraction du lactose sont connus mais demeurent très coûteux, ce qui fait en sorte que cette avenue de valorisation n'est pas à la portée de tous les industriels (Jacques, 1993), Le lactose est ainsi transformé en un acide acétique, l'acide propénoïque et l'acide butyrique. Ces acides ont la propriété d'être utilisables par l'industrie alimentaire comme précurseur d'aromate (Morin *et*

al, 1994) ou comme agent de conservation (Jacques, 1993). En principe il existe plusieurs voies de valorisation du lactosérum dans les différentes industries, par exemple en domaine pharmaceutique et agroalimentaire. Avec le temps la stratégie de mettre en valeur de coproduit est devenue plus diversifiée. **La figure 5** présente quelques produits obtenus à partir du lactosérum.

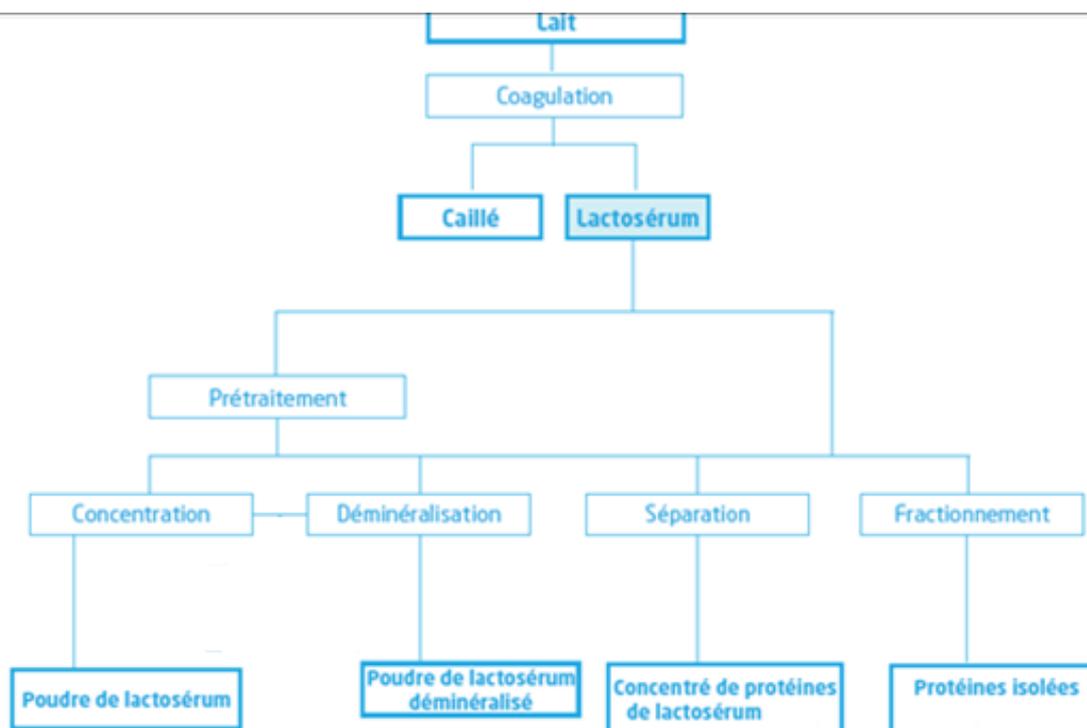


Figure 5: Quelques chemins de valorisation de lactosérum (Jacquet et al., 1999)

2. Affouragement bovin

- Vaches laitières

Le petit-lait peut être affouragé aux vaches laitières. C'est un aliment très appétent, mais compte tenu de sa concentration élevée en sucres, il présente un risque d'acidose rumine. Sa consommation doit donc être limitée. De plus, à la différence des céréales, il ne stimule pas l'activité de la panse bovine. Contrairement aux porcs où le petit-lait est incorporé à la ration de « soupe », les bovins le consomment à l'état liquide. Petit-lait remplace le fourrage de base (Bleiker et al 2002).

3. Valorisation énergétique

a. Production de bioéthanol

La filière bioéthanol peut apporter une contribution significative à la réduction des émissions de CO₂ dues aux transports. Le bioéthanol à partir du lactosérum se base sur la fermentation alcoolique du lactose, puisqu'il est le sucre le plus abondant dans ce coproduit, mais le plus important dans le procédé de fermentation, c'est la sélection de microorganismes qui ont une grande capacité de fermenter le lactose en éthanol dans un délai très court et en présence d'oxygène. Avec l'étude bibliographique, il est démontré que les levures de genre *kluveromyces* possèdent cette capacité typique. Une fois le lactose hydrolysé en glucose et galactose, les deux sucres sont ensuite utilisés au cours de la glycolyse pour produire de l'éthanol et du dioxyde de carbone selon la réaction de Gay Lussac $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$ (Yang et al., 1995 ;Zafar et al., 2006), **la figure 6** résume le procédé de production de l'éthanol à partir du petit lait.

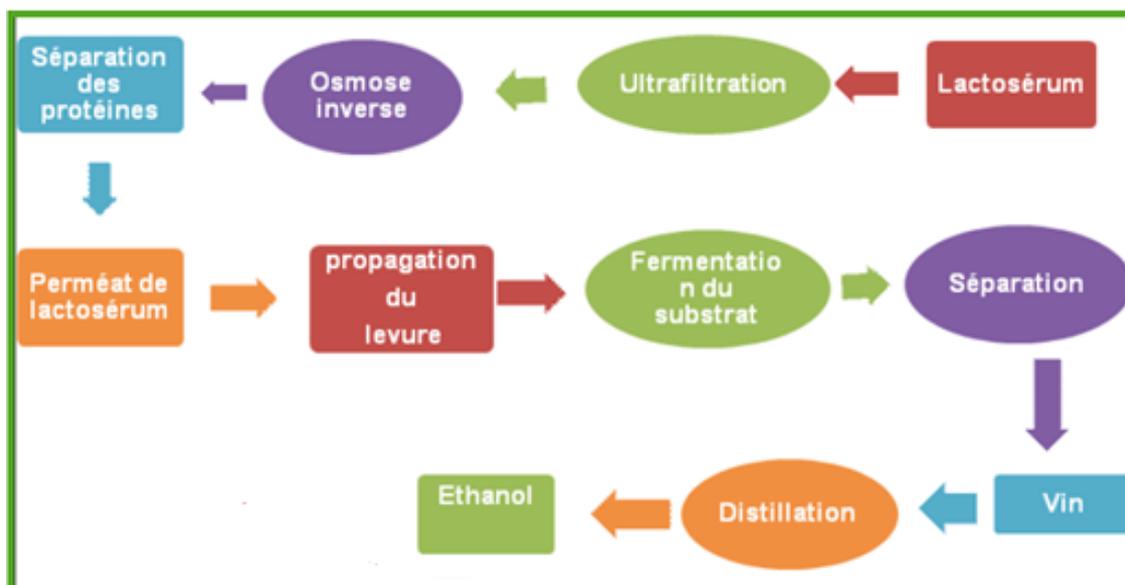


Figure 6: Principales étapes de la production de l'éthanol à partir du lactosérum (TEBBOUCHE Latifa., 2012).

b. Production de biogaz

La digestion anaérobie ou méthanisation consiste à transformer la matière organique (sucres, protéines et graisses) en l'absence d'oxygène pour produire du biogaz, c'est à dire un mélange de méthane et de gaz carbonique. La transformation est réalisée par un ensemble de bactéries anaérobies. Dans certains cas et pour des substrats particuliers (eaux usées industrielles, déchets alimentaires...), le processus (résumé dans **la figure 7**) peut être réalisé

en deux étapes dans deux cuves différentes, l'une pour l'acidification et l'autre pour la méthanisation. L'idée de base c'est que les deux étapes de digestion anaérobie ou de production d'hydrogène et de méthane peut avoir lieu dans deux bioréacteurs séparés en série (Heg Z et al., 2008).

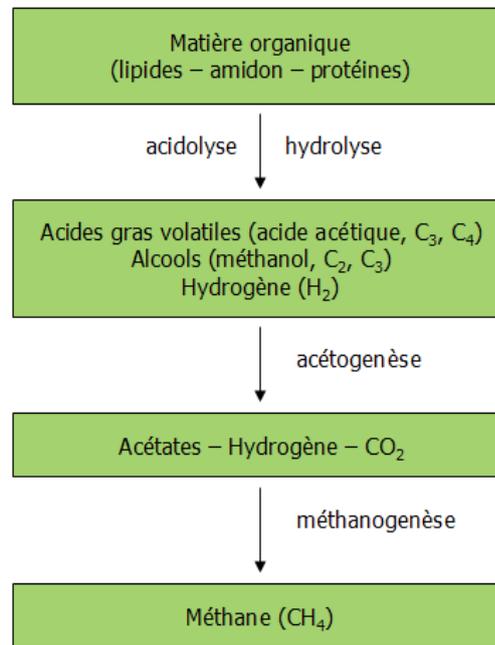


Figure 7: Procédé biologique de production de méthane (Uneo et al., 2007)

la méthanisation présente des avantages pour l'épuration des effluents très chargés comme le petit-lait, avant leur rejet en station d'épuration. Le biogaz se prête, éventuellement après épuration, à toutes les applications du gaz naturel :

- utilisation en chaudière
- valorisation électrique et thermique par cogénération
- injection dans le réseau de gaz naturel, après une épuration en fonction du type de réseau
- utilisation, après épuration, comme carburant dans tout véhicule fonctionnent au gaz naturel (Office fédéral de l'énergie, France 2004).

Partie II : Matériel et Méthodes

I) Procédures avant la fermentation en aérobie

1. Echantillonnage

Cette étude porte sur des margines brutes provenant d'une huilerie industrielle située à Doukkarat dans la ville de Fès, durant la campagne oléicole 2014-2015. Les prélèvements sont effectués dans des flacons, puis transportés rapidement au laboratoire dans des glacières à une température de 4°C. Ensuite, stérilisés au même temps à 120 °C pendant 45min.

Le lactosérum provient d'un producteur artisanal situé à Mhaya, zone rurale près de la ville Fès. Durant les mois de Février à d'Avril, les prélèvements sont effectués dans des flacons, puis transportés directement au laboratoire à une température de 4°C, ensuite prétraités et fermentés sur place.

2. Matériel biologique

Les souches de levures sont isolées dans les années précédentes par l'équipe de recherche (Pr. Mohammed Ettayebi et Pr. Latifa Jamai) dans le laboratoire de biotechnologie à la Faculté des sciences de Fès. Cet isolement a été réalisé à partir de plusieurs biotopes : fruits secs (différentes variétés de dattes, raisin sec), fromage, beurre fermenté, lactosérum et margines. Les levures isolées sont capables de se développer à une température assez élevée (jusqu'à 45°C), en plus les souches de levures sélectionnées se multiplient dans deux types de milieu, milieu industriel comme la margine, sachant qu'elles sont riches en polyphénols, et dans le lactosérum protéinés et dé protéinés, ainsi que les milieux du laboratoire YPG et YPS.

Les souches de levures sélectionnées (KL3, B et 63 à partir du lactosérum, H2B1, Gr2 et Gr1 sur margines) sont stockées à la température de -20°C dans YPG solide avec 30 % de glycérol. À partir de ce stock, on repique le milieu YPG- agar, l'incubation se fait à 30°C pendant 48 heures, la forme des colonies de levures est présenté dans **la figure 8**. Les colonies sont inoculées dans le milieu liquide YPS après la vérification de leur forme microscopique au microscope optique à un grandissement de 40 X. Ainsi, avant la fermentation, on vérifie la forme pour se rassurer de la non-contamination de notre culture.



Figure 8: Aspect des colonies de levures sur milieu YPG solide.

3. Les milieux de culture

3.1 Milieu de laboratoire

a. Milieux utilisés pour la culture des levures

YPG-agar:

C'est un milieu de culture solide pour l'isolement des levures, sa composition est la suivante :

- Peptone.....2%
- Glucose.....2%
- Extrait de levure.....1%
- Agar.....2%
- Eau distillee qsp.1 Litre

10 µg/ml de kanamycine est ajouté après la stérilisation et le refroidissement du milieu YPG jusqu'à 50 °C.

b. Milieu YPS liquide pour la fermentation

- Peptone.....2%
- Saccharose.....15%
- Extrait de levure.....1%
- Eau distillé qsp 1 Litre

Remarque :

Les milieux YPG et YPS contiennent les mêmes composés sauf que dans le milieu YPS le saccharose remplace le glucose. Dans les conditions de culture sur boîte la concentration du

sucres dans le milieu est de 2% seulement, alors qu'elle est de 15% dans les conditions de fermentation alcoolique.

3.2 Milieux industriels

a. Margine

Ce substrat représente le déchet du procédé de la production d'huile d'olives, il est riche en polluants organiques. La préparation de margine commence par la filtration afin d'éliminer les grosses particules, puis une stérilisation du filtrat et une dilution par l'eau distillée à 1/7,1/2. L'ajout des suppléments dans des conditions aseptiques se fait selon les proportions suivantes : 0.1% d'extrait de levure, 0.3 % de sulfate d'ammonium comme source inorganique d'azote et 0.15% dihydrogénophosphate de potassium qui présente la source de phosphate.

b. Lactosérum protéiné

La procédure de préparation de notre milieu pour la fermentation est la suivante: Le petit lait est chauffé à 62°C pendant 20 min, puis refroidit à 48°C pendant 30 min. Avant la répartition dans les erlenmeyers stériles de 100 ml, le lactosérum est supplémenté par 0.07% de NH_4OH et 0.25% de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ qui présentent la source d'azote et de phosphore respectivement.

c. Lactosérum dé-protéiné

La technique de préparation du petit lait avec la moindre teneur en protéine, se résume comme suit : le Chauffage du lactosérum à 95°C pendant 15 min pour la coagulation des protéines, suivie d'une filtration puis stérilisation à 120°C pendant 5 min. La supplémentation est faite de la même façon que pour le lactosérum protéiné.

4. Evaluation de la charge organique des déchets agroindustriels

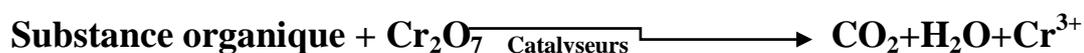
La mesure de la charge organique des effluents industriels est faite directement par des paramètres biologiques et chimiques, principalement: la DCO et DBO5

4.1 Demande Chimique en Oxygène (DCO)

- Définition et principe

La DCO correspond à la consommation d'O₂ nécessaire à l'oxydation complète de la matière organique du substrat, cette oxydation peut être obtenue par le dichromate de potassium en excès, et en présence du sulfate d'argent comme catalyseur et du sulfate de mercure comme complexant des chlorures, d'où une méthode d'évaluation de la DCO au cours de laquelle l'excès de dichromate est dosé par l'argent.

- La réaction chimique:



- Mode opératoire

Dilution de l'échantillon au 1/1000, selon (la norme AFNOR NF T90-101).

1. l'ajout de 0.04g de HgSO₄ sulfate de mercure à 2 ml de l'échantillon.
2. L'addition de 3 ml d'Ag₂SO₄ plus 1ml de K₂Cr₂O₇
3. La mise de l'échantillon préparé en DCO mètre pendant 2h à 150°C
4. La mesure de la Densité Optique (DO) est faite par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 620 nm, en se basant sur une gamme d'étalonnage pour déterminer la concentration réelle dans l'échantillon analysé.

+ Remarque :

À la fin de la fermentation alcoolique, la méthode de calcul de la DCO diffère de celle de la DCO initiale seulement par le facteur de dilution. Dans notre essai la dilution effectuée est 1/100, généralement l'effluent traité doit avoir une dilution comprise entre 1/100 et 1/200, puisque il est moins chargé pour faciliter la lecture de la densité optique dans le DCO-Mètre.

4.2 Détermination de DBO5

- Définition et principe

La valeur de la demande biologique en O₂ pendant 5 jours représente la quantité en g d'O₂ nécessaire aux microorganismes mis en incubation avec l'échantillon pour oxyder les matières assimilables organiques à 20°C et à l'obscurité sous agitation. La valeur de DBO5 est déterminée selon la méthode respirométrique en enceinte thermostatique à l'aide de DBO5-mètre présenté dans **la figure (9)**.

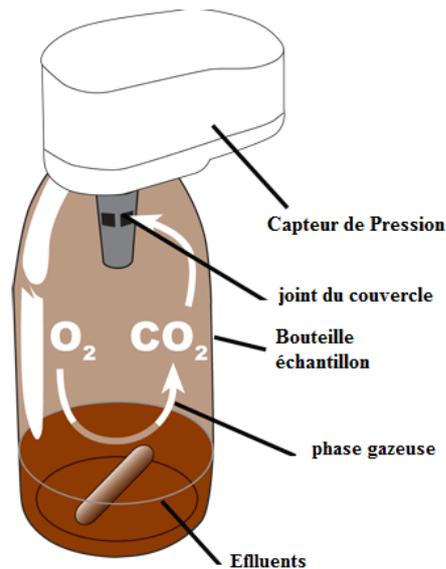


Figure 9: Principe de fonctionnement de l'appareil DBO5- mètre.

- Mode opératoire

Dilution de l'échantillon au 1/100 sème, en se référant à la norme AFNOR, T 90-103, le volume de l'échantillon dilué est de 97 à 164 ml.

- L'échantillon est mis dans un flacon spécial
- L'ajout de deux pastilles de NaOH.
- Incubation à 20°C pendant 5 jours, sous agitation
- Le résultat affiché est multiplié par un facteur de 100.

✚ Remarque :

En ce qui concerne la mesure de la DBO5 de l'effluent traité par les levures, la méthode de mesure est la même que DBO5 de l'effluent à l'entrée, la différence réside seulement dans le volume de l'échantillon et le facteur de dilution. À propos de notre échantillon analysé, le volume de la prise d'essai en poste fermentation est 365 ml sans dilution, afin que la DBO5 pourra être détectable par l'appareil : DBO5-Mètre. L'analyse est répétée deux fois pour DBO5 et DCO avant et après la fermentation.

5. Pré-culture

Les pré-cultures au niveau laboratoire sont réalisées dans des erlenmeyers de 100 ml contenant 20 ml de milieu YPS à 7% de saccharose pour adapter les levures aux fortes concentrations en sucre. Ces milieux liquides sontensemencés par des colonies bien séparées sur la gélose YPG, puis incubés 24 heures sous agitation (150 rpm) à 37°C.

II) Procédures au cours et après la fermentation alcoolique

1. Procédé de fermentation à l'échelle laboratoire

6. Fermentation

Inoculation de 35 ml de milieu YPS à 15% de saccharose, lactosérum protéiné et dé protéiné et margines avec 3 ml d'une pré-culture fraîche pour chaque milieu de culture. L'incubation est effectuée à trois températures différentes 37°C, 42°C et 45°C, sous agitation pendant 48h pour le milieu YPS et 72 heures pour les margines et le lactosérum. Le mode de fermentation en batch utilisé est présenté dans **la figure 10**.

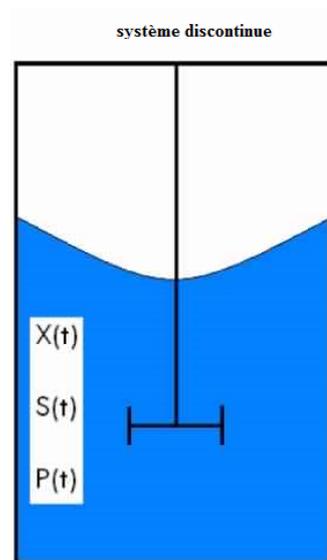


Figure 10: Procédé de fermentation en discontinu.

Avec $S(t)$, $X(t)$ et $P(t)$ présentant respectivement la variation de la concentration volumique dans le temps de substrat, la biomasse et le produit de métabolisme.

2. Vérification de l'efficacité de la fermentation alcoolique

a- Production de la biomasse

D'abord, une centrifugation de 20 ml du milieu fermenté à 5000 rpm pendant cinq minutes à 4°C dans des tubes Falcon. Ensuite, une élimination du surnageant et récupération du culot qui va être lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile, puis un séchage à l'étuve à 100°C pendant 24 heures. Le poids de la biomasse sèche est calculé en faisant la différence entre le

poids initial (la tare) et le poids final du tube Falcon, le poids de biomasse sèche est exprimé en g/l.

b- Détermination du pH avant et après la fermentation des milieux

En avant et post fermentation la mesure du pH est réalisée pour chaque milieu de culture. Précisément après la centrifugation, on introduit la sonde de pH-mètre bien étalonnée dans le surnageant de culture, d'une part pour connaître le pH initiale des milieux utilisé pour la fermentation alcoolique, et d'autre part afin d'avoir une idée sur le pH optimum qui correspond à une souche de levure dans un milieu de culture bien déterminé.

c- Dégradation de la matière organique et des polyphénols

Cette partie est très intéressante dans notre étude, parce que à travers ces paramètres il est possible d'estimer la capacité des souches au niveau du traitement des margines. En se basant sur la mesure de DBO5 et DCO avant et après la fermentation, le rapport entre les deux résultats est effectué pour connaître le rendement de l'épuration, ainsi l'observation de la couleur des milieux dans les mêmes conditions donne une idée préalable sur l'efficacité de la bio remédiation des déchets agro-industriels surtout dans le cas des margines.

Afin d'estimer le pourcentage exact de l'élimination des polyphénols, la mesure de la densité optique a été réalisée avant et après la fermentation alcoolique des margines. Le pourcentage de cette dégradation est obtenu par la comparaison de l'absorbance des échantillons fermentés avec celle non fermentée où les margines sont à l'état brute, la lecture de la densité optique se fait à 535.5 nm. Ces essais sont répétés deux fois.

d- Récupération de l'éthanol par distillation

La récupération de l'éthanol se fait par la technique de l'hydro distillation (**figure 11**). La prise de 10 ml de culture fermentée est centrifugée puis mélangée avec 10 ml de l'eau distillée. 10 ml de distillat est récupéré. Le taux d'alcool éthylique produit au cours de la fermentation est déterminé par réfractomètre, en se référant à une gamme d'étalonnage établie à partir d'un mélange d'eau distille et d'éthanol à différents pourcentages.

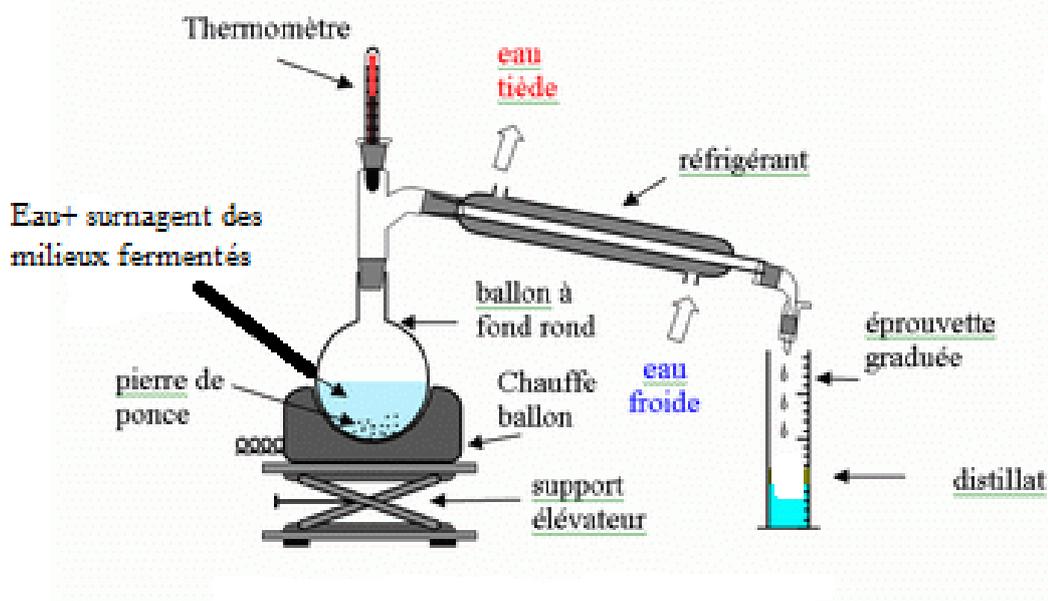


Figure 11: Principe de l'hydro distillation.

- Mesure par le réfractomètre

Dans un premier temps, on effectue ces différentes opérations en regardant dans l'oculaire en agissant sur le bouton moleté de droite, amener dans le champ de vision la limite de séparation des deux zones claire et obscure. Cette ligne de séparation est plus ou moins nette. En agissant sur le bouton moleté de gauche qui commande la rotation du système compensateur (série de prismes compensateurs), obtenir un maximum de contraste entre les deux plages et une ligne de séparation aussi nette que possible, Enfin, ajuster cette ligne de séparation à l'intersection du réticule, en agissant à nouveau sur le bouton moleté de droite.

Une fois ces opérations effectuées, il suffit de regarder dans l'oculaire (celui du haut) et de lire la valeur de l'indice de réfraction sur l'échelle supérieure. En effet, deux échelles sont visibles : l'échelle supérieure ou à droite indique la valeur de l'indice de réfraction et l'échelle inférieure ou située à gauche, graduée de 0 à 85, donne en pourcentage la teneur éthanol.

Dans notre essai la solution mère contient 12% d'éthanol. **Le tableau 5** porte les points nécessaires pour tracer notre gamme étalon. Afin d'avoir des résultats représentatifs, il faut déterminer cinq à huit points dans la courbe d'étalonnage. Notre gamme étalon présente un coefficient de régression $R^2=0.98$.

Tableau 5: Gamme de calibration de réfractomètre.

Pourcentage d'éthanol (%)	Valeur obtenu par le réfractomètre
0	0
3	0.3
6	1.8
9	2.8
12	3.8

Remarque :

La mesure de la production de l'éthanol, de la biomasse et du pH après la fermentation, ont répétés trois fois pour chaque souche sélectionnée et dans les différentes températures. Les analyses statistiques sont faites par le programme **Graph Pad PRISM (version 5)**.

2. Optimisation de la concentration des margines

Les essais sont réalisés à différentes dilutions de margines brutes : 1/2, et 1/7. A une température de 37°C, sous agitation à 162 rpm, le volume utile est de 35 ml de milieux dans des erlenmeyers de 250 ml pour chaque souche. Ces tests sont faits en triplicata, la supplémentation de ces milieux est la même que celle décrite précédemment. Durant ces expériences le milieu YPS est utilisé comme témoin.

4. Cinétique de la fermentation sur Margines et YPS à 15% de saccharose

Avant la fermentation, il faut passer par une pré-culture pour adapter les microorganismes aux conditions de fermentation, et pour augmenter la quantité des microorganismes (qui vont assurer la fermentation proprement dite). Puisqu'on travaille dans un grand volume, il est nécessaire d'extrapoler aussi le volume de pré-culture. Dans notre étude le volume de ce dernier est de 333 ml de YPS à 7% de saccharose introduit dans l'erlynemier de 1 L et il estensemencé par la souche performante H2b1 sélectionnée selon les essais précédentes. Après 24 h d'incubation à 37°C et sous agitation (150 rpm), des centrifugations sont réalisées pour concentrer les levures, puis le lavage de la biomasse par l'eau physiologique stérile est effectué. D'autres centrifugations sont appliquées, et la biomasse concentrée est récupéré.

Trois grammes de ce dernier sont inoculés dans les milieux de culture YPS à 15% de saccharose et des margines, cette dernière est suppléementée par 0.3% de sulfate d'ammonium, 0.1% d'extrait de levure et 0.15% de dihydrogénophosphate de potassium. Le volume de ces milieux est de 650 ml dans l'erlynimier de 2 L. Le suivi de la fermentation se fait à 37°C avec

agitation pendant 96 heures, chaque 12 heures le prélèvement est effectué pour suivre l'évolution de la biomasse, pH et l'éthanol produit, et pour mesurer la densité optique des milieux afin de déterminer la cinétique de croissance. Après la fermentation, le reste de la culture est utilisé pour calculer la DCO et la DBO5 finale dans l'objectif d'évaluer l'épuration biologique par cette souche thermotolérante de levure.

Résultats et Discussion

A) Margines

I) Evaluation de la charge organique des déchets agro-industriels

1. La charge organique des effluents

La mesure de DBO5 et DCO de nos échantillons avant le traitement donne une idée sur le niveau de pollution présenté par ces effluents industriels. Le rapport de ces paramètres calculé avant la fermentation ou traitement permet de nous renseigner sur la biodégradabilité de nos déchets. **Le tableau 6** présente la relation entre le rapport DBO/DCO et la faisabilité de traitement biologique.

Tableau 6: Relation entre le rapport DBO5/ DCO et la faisabilité de traitement (Radoux, 1995).

DBO/DCO>0,6	Effluent traitable par les procédés biologiques
0,2<DBO/DCO<0,6	Effluent traitable en utilisant des souches microbiennes sélectionnées
DBO/DCO<0,2	traitement biologique impossible

Le tableau 7 démontre qu'avant le traitement, la DBO5 des margines et du lactosérum sont proches car les margines contiennent des poly phénols qui réduisent la DBO5 de cet effluent par rapport à la DCO.

Tableau 7: DCO et DBO5 des margines et de lactosérum bruts avant le traitement.

Milieu	DBO5 (g/l)	DCO en g d'O ₂ /l	DBO/DCO
Margine	23.5	100	0.23
Lactosérum	25.7	28	0.78

Les valeurs obtenues montrent que nos échantillons sont très chargés en matière organique. Elles sont en bonne concordance avec les valeurs trouvées dans la bibliographie ($20 < \text{DBO} < 50$). Les valeurs de DCO pour les deux effluents sont différentes.

A la lumière de ces résultats, les margines sont plus chargées en matière organique que le lactosérum, aussi les margines demandent des microorganismes sélectionnés pour leur traitement contrairement au lactosérum. Il est important de noter que ce dernier présente un rapport DBO/DCO qui tend vers 1, ce qui traduit la bonne aptitude à la dégradation biologique des composés chimiques contenu dans le petit lait. Cette remarque ne fait confirmer que le lactosérum constitue pour les micro-organismes un excellent aliment équilibré en source de carbone, d'azote et de phosphore et qu'il est possible d'épurer les

effluents provenant du lait par un processus biologique simple. En plus la majeure partie de DCO provient du lactose, les protéines présentent seulement 10 g/l de DCO. Cela a été démontré par plusieurs auteurs (Domingues et al. 1999; Siso., 1996).

II. Vérification de l'efficacité de fermentation sur les milieux YPS et margines

1. Production de la biomasse

La production de la biomasse cellulaire (exprimée en gramme de poids sec par litre) est mesurée pour chaque souche de levure dans les conditions de culture déjà citées dans la partie matériel et méthodes. Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes (les figures 12 et 13) :

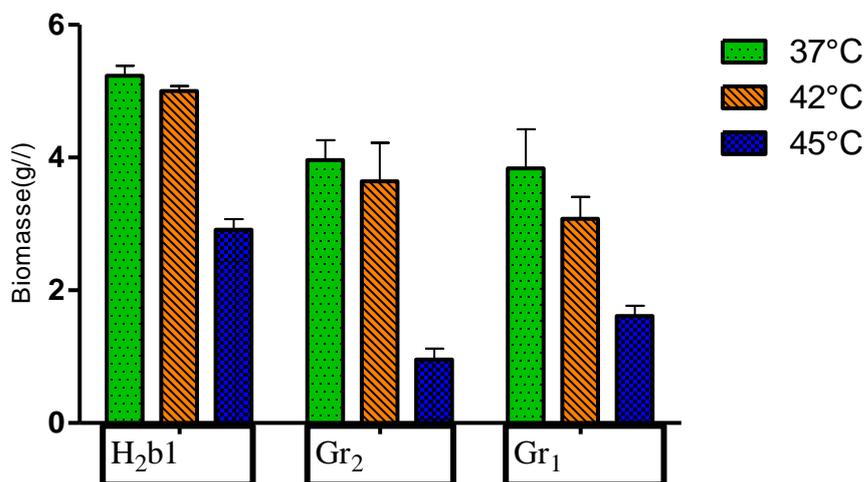


Figure 12: Production de la biomasse par les souches de levures H₂b1, Gr₂, Gr₁ à partir du milieu YPS à 37°C, 42°C et 45°C pendant 48 heures (n=3)

Dans le milieu YPS, la formation de la biomasse est importante pour la souche H₂b1 à 37°C avec une production maximale de 5.3 g/l. Sachant que la température optimale de la croissance pour les levures est de 30 °C, la production de la masse cellulaire à 42 °C et 45 °C présente un grand intérêt industriel, en plus la réduction légère de cette production ne dépasse pas 15 % quand en passe de 37 °C à 42 °C pour les trois souches de levures.

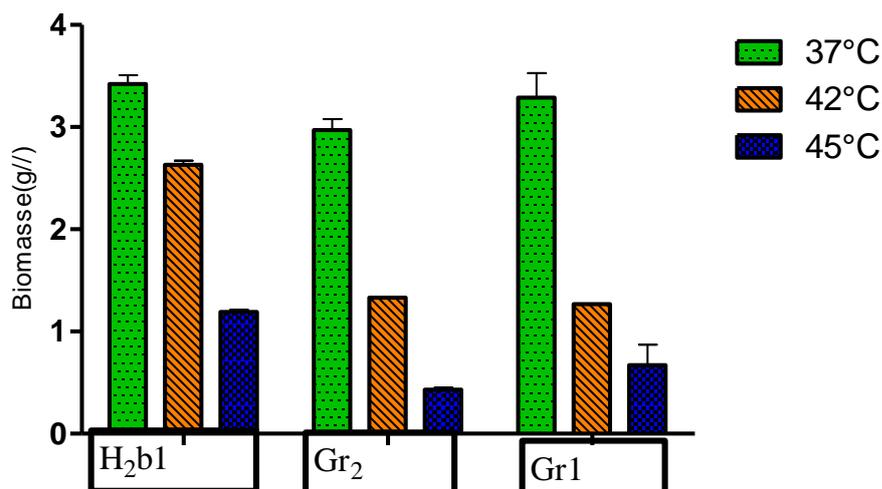


Figure 13: Production de biomasse par les souches de levures H2b1, Gr2, Gr1 à partir des margines de dilution 1/7 à 37°C, 42°C et 45°C durant 72 heures (n=3).

Même avec les margines comme effluent toxique, la production de la biomasse est remarquable pour toutes les souches, malgré l'augmentation de la température jusqu'à 45 °C la production ne cesse pas précisément chez la souche H2b1. On note seulement une réduction qui ne dépasse pas 20% allant de 37°C à 42°C.

Ces résultats montrent que la production de la biomasse est un peu plus élevée sur milieu YPS que sur les déchets oléicoles (margines) à 37 °C. Cette constatation est logique puisque YPS est un milieu de laboratoire complet, ainsi la souche H2b1 dans les conditions thermophiles se caractérise par une grande capacité de production de la masse cellulaire (figure 12 et 13).

2. Synthèse de l'éthanol

L'éthanol produit en g/l par les différentes souches, dans les conditions de culture déjà précisées, permet de donner les résultats exposés sous forme d'histogrammes (figures 14 et 15). Ces valeurs présentent la moyenne du taux d'éthanol produit en 48 heures sur YPS à 15 % de saccharose et 72 heures sur les margines.

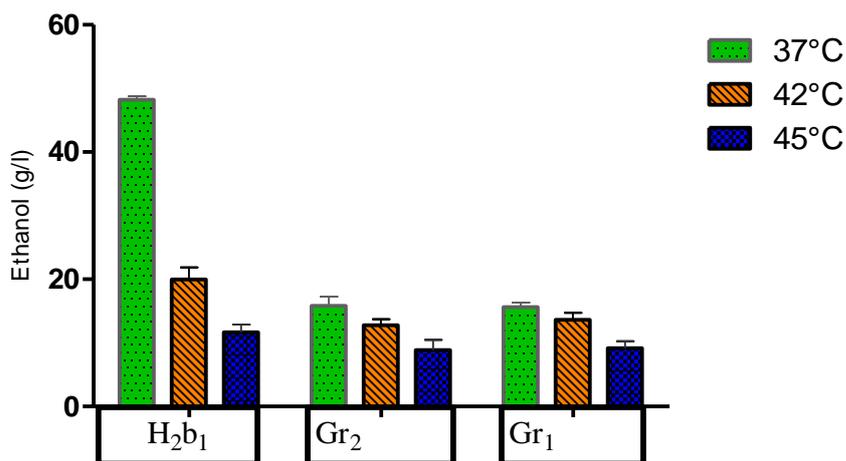


Figure 14: Quantités d'éthanol produites par les souches de levures H2b1, Gr1, Gr2 après la fermentation pendant 48 heures sur YPS à 37°C, 42°C et 45°C (n=3)

Les souches de levures cultivées sur YPS indiquent une production de l'éthanol dans les différentes températures même à 45°C. Il est aussi constatable que le microorganisme H2b1 est le plus producteur. La comparaison de la production de bioéthanol par les différentes souches en fonction des températures de fermentation permet de conclure que l'augmentation de ce paramètre physique n'affecte pas d'une façon intéressante la productivité en éthanol dans le milieu YPS précisément chez Gr1 et Gr2.

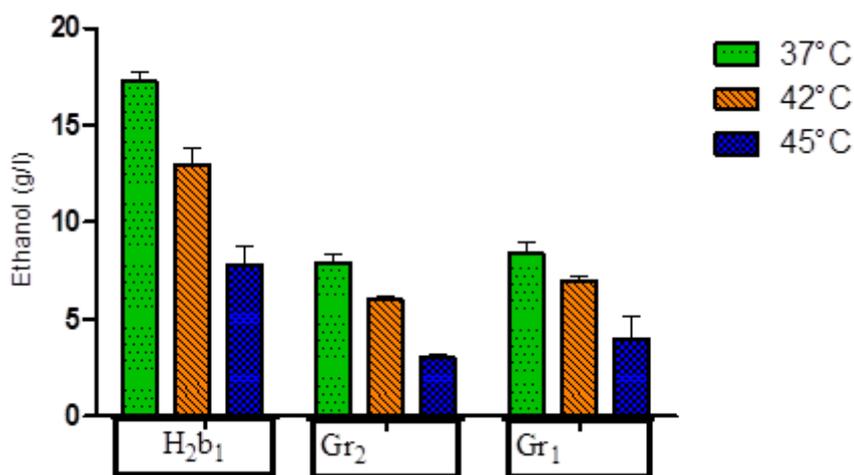


Figure 15 : Quantités d'éthanol produites par les souches de levures H2b1, Gr1, Gr2 après fermentation sur margines à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures (n=3).

La figure 15 montre qu'il y a un taux d'éthanol élevé produit par la souche H2b1 cultivé sur margines, avec la concentration maximale qui égale 13g/l à la température 42°C. Le résultat le plus marquant est la production du bioéthanol à 45°C, en plus de l'observation d'une réduction minimale de la quantité produite avec l'élévation de la température. A titre

d'exemple la souche Gr2 présente une diminution en production qui ne dépasse pas 23% quand on passe de 37°C à 42°C.

Les observations remarquées pour la production du bioéthanol sont les mêmes en comparaison avec la production de la biomasse concernant les souches étudiées dans les deux milieux de cultures. En plus la variation de la température a le même effet sur la production du bioéthanol et de la biomasse. A propos de formation de la masse cellulaire sur les margines, une étude faite par (Aissam et al 2003) a démontré que les microorganismes adaptés aux eaux de végétation produisent la biomasse et par conséquent ont dégradé leur matières organiques, donc nous assistons toujours à une croissance de tous les microorganismes testés. Cette croissance est évaluée par la biomasse produite.

En ce qui concerne la quantité du bioéthanol produit, il est en concordance avec la quantité obtenue par (Raghu et al., 2015). Dans cette étude, la fermentation par les souches de levures se fait sur les déchets du papier.

3. Variation du pH avant et après la fermentation sur YPS et Margines

La mesure du pH est très intéressante dans le système de culture biologique, soit en avant ou en aval de la fermentation, car le potentiel de proton H^+ est l'un des paramètres qui est impliqué dans le métabolisme fermentaire chez les microorganismes. Alors on a mesuré le pH avant et après la fermentation en discontinu dans chaque milieu de culture, et par rapport aux espèces de levure. Les valeurs obtenues sont présentées dans **les figures 16 et 17** à différentes températures. Elles représentent la moyenne de trois essais avec une marge d'erreur bien définie.

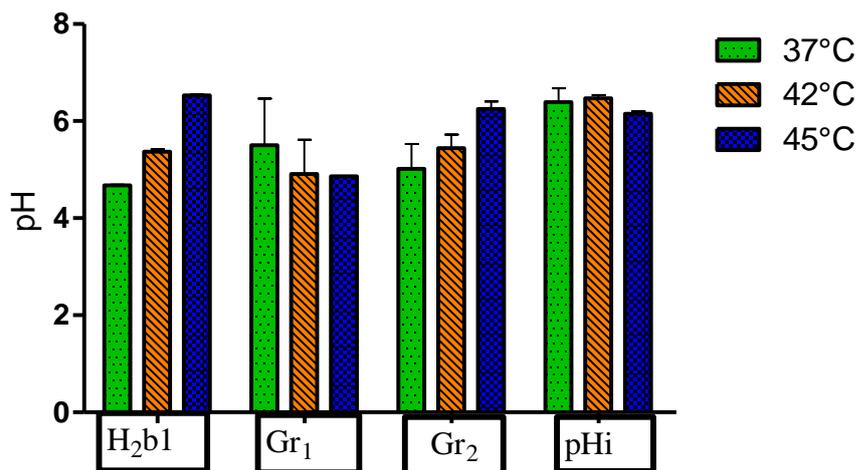


Figure 16: Variations du pH après la fermentation sur milieu YPS par les souches de levures H2b1, Gr1, Gr2 à 37°C, 42°C et 45°C pendant 48 heures (n=3).

Pour les trois températures, le pH diminue d'une façon peu importante après la fermentation sur YPS passant de 6.2 à 5 en moyenne pour toutes les souches, ce qui prouve que les levures ont le même comportement vis-à-vis de facteur chimique, ainsi la température n'affecte pas d'une façon importante le pH de culture.

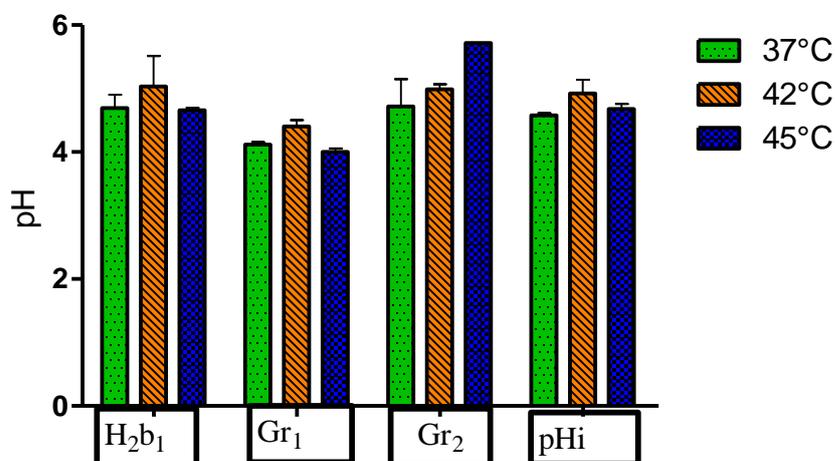


Figure 17: Variations du pH après fermentation sur le milieu margine par les souches de levures H2b1, Gr1, Gr2 à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures (n=3).

Les valeurs du pH à l'état initial et final ne démontrent pas un grand changement dans les margines et pour les différents souches cultivées à 37,42 et 45°C. Donc la température ne possède pas un grand effet sur le pH, surtout pour ces effluents oléicoles,

En résumé le pH du milieu YPS diminue après la culture d'une façon faible, mais le pH des Margines reste presque stable. Cette remarque est valable pour toutes les souches douées

d'une capacité de production de la biomasse cellulaire et d'éthanol en se référant au pH initial. Alors cet effet peut être dû à l'action déterminante du pH initial sur le comportement des microorganismes choisis et à la composition des deux milieux. Ceci est due à la dégradation des composés organiques portant des groupements $-COOH$ qui sont libérés et contribuent à une diminution légère du pH observé dans le milieu YPS et puisque le métabolisme est dirigé vers la production de l'éthanol, il y a une production faible des acides organiques.

D'autre part, une petite élévation de pH dans les margines observée est dû probablement à la dégradation microbienne des suppléments azotés, libérant des ions NH_4^+ qui sont des bases, ou à la dégradation des acides phénoliques et organiques portant des groupements COO^- et/ou OH^- comme l'acide lactique et l'acide acétique qui sont présents dans les margines (Ercoli et Ertola, 1983). En rassemblant les deux phénomènes durant la croissance, le résultat se manifeste dans l'équilibre du pH à l'état final. Ce qu'on observe est une convergence du pH final de chaque souche vers son pH optimal, en plus la variation du pH avant et après la culture ne change pas beaucoup, ce qui a été démontré aussi par Zenjari et al. (1999). Généralement il reste au alentour de 5 comme moyenne pour les margines et le milieu YPS.

La suite de ce travail exige aussi l'optimisation du facteur de dilution des margines, afin d'augmenter le rendement de production de la biomasse et/ou de la bioéthanol. Par la suite nous pourrons augmenter le volume de la culture et étudier la cinétique de la fermentation sur YPS et margines afin de connaître la vitesse de croissance de la souche performante sur les deux milieux.

III. Optimisation de la concentration des margines

1. Effet de la dilution sur la production de la biomasse sur les margines.

L'étude de la production de la biomasse en parallèle avec la formation du bioéthanol dans les mêmes conditions est intéressante. Cette stratégie est nécessaire pour bien optimiser les conditions de culture, ainsi que pour avoir une idée sur le comportement des microorganismes dans les milieux de culture en prenant en compte plusieurs paramètres utiles qui pourront avoir un impact direct sur la productivité après la mise en culture. **La figure (18)** présente la formation de la biomasse après la fermentation durant 72 heures à $37^\circ C$ sur les margines brutes et diluées (dil), également sur le milieu YPS (à 15% de saccharose) qui présente le témoin.

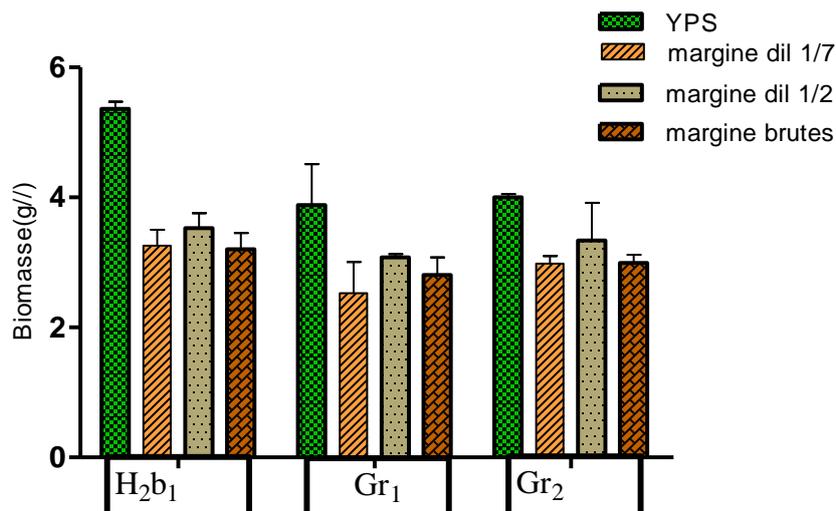


Figure 18 : Biomasse formé après la fermentation des margines brutes et diluées par les souches de levures (n=3).

Les quantités de biomasse obtenues dans les margines brutes et aux dilutions 1/2 et 1/7 sont presque les mêmes, à la température 37°C et aux mêmes conditions de culture. Donc nos souches de levures possèdent une grande résistance à la concentration élevée de substrat toxique, précisément chez la souche H2b1 qui possède la plus grande capacité de production de la masse cellulaire. Pour cette souche de levure, il n'existe pas une différence significative entre les différentes concentrations des margines.

2. Effet de la dilution sur la production de l'éthanol

La dilution des margines peut jouer un rôle primordial dans l'activité métabolique des levures sélectionnées, puisque ces déchets oléicoles sont plus chargés par les différents composés organiques et inorganiques et qui peuvent impliquer une inhibition de l'activité métabolique des microorganismes. **La figure (19)** reporte la variation de la production du bioéthanol pour différents dilutions, et après 72 heures de fermentation des cultures à 37°C. Le milieu de culture YPS à 15% de Saccharose est pris comme témoin.

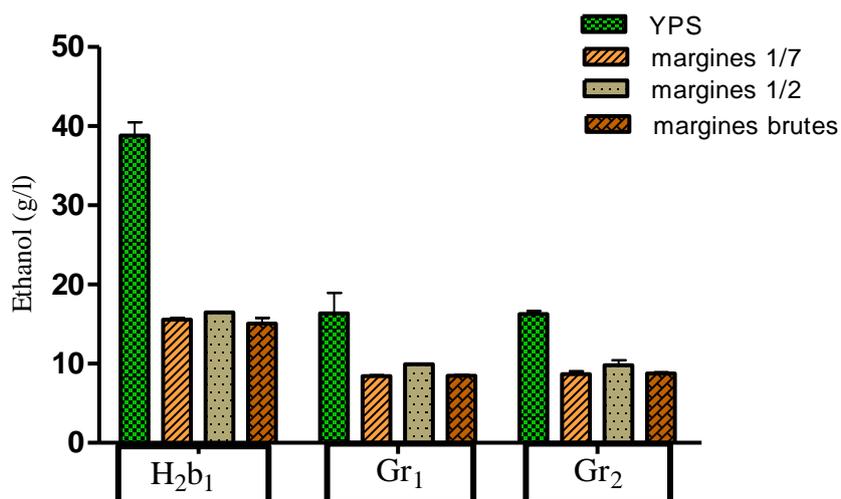


Figure 19: Bioéthanol produit par les levures à différentes dilutions des margines (n=3).

La première remarque attirante est la grande capacité de production de l'éthanol par la souche H₂b₁ aux différents dilutions des margines qui n'affectent pas la productivité de bioéthanol chez les trois souches. Alors l'ensemble des concentrations des margines n'exerce pas un effet négatif ni sur la production de la biomasse ni de l'éthanol agricole chez les levures isolés. Aussi la production de ces derniers est intéressante chez la souche H₂b₁ par apport à Gr₁ et Gr₂.

En comparant la production du bioéthanol et de la biomasse, on constate que la quantité de l'éthanol formée est largement supérieure à la biomasse, ceci est expliqué par la voie du métabolisme piloté par ces conditions qui dirige l'activité métabolique des souches de levures vers la production du bioéthanol. Donc il y a la possibilité de prendre les margines comme milieu convenable pour la production du bioéthanol en utilisant les levures thermotolérantes, ce qui est tout à fait logique puisque on travaille dans l'aérobie et sur les margines très chargées par les sels minéraux, source de carbone, d'azote et de phosphore.

La concentration des sucres complexes qui ne dépasse pas 3g/l dans ce rejet oléicole, a montré que les micro-organismes dans les margines utilisent pour leur métabolisme les produits de dégradation des composés phénoliques, ainsi que ceux des sources glucidiques. Donc, ces souches de levures empruntent des voies métaboliques non spécifiques pour produire l'énergie et l'éthanol (Sayadi et Ellouz, 1993 ; Martin et al., 1994 ; Kahraman et Yesilada, 1999). En plus de la quantité des sucres présentées sous forme des sucres complexes nécessite dans la plupart des cas une activité hydrolytique pour améliorer le rendement (Raghu et al., 2015).

IV. Bio remédiation des margines

1. Dégradation des polyphénols

La couleur typique brune-noirâtre des margines est expliquée par la présence des polymères de polyphénols. Ils constituent la lignine à pH acide comme structure plus stable et qui résiste à la dégradation (Bazoti et al., 2006). Durant nos essais on observe plusieurs fois la clarification des margines fermentées par les différents souches de levures, **La figure 20** présente le milieu des margines filtrées et diluées au 1/7 puis fermentés par les trois souches de levures à 37°C, avec le témoin et qui passe dans les mêmes conditions de culture.

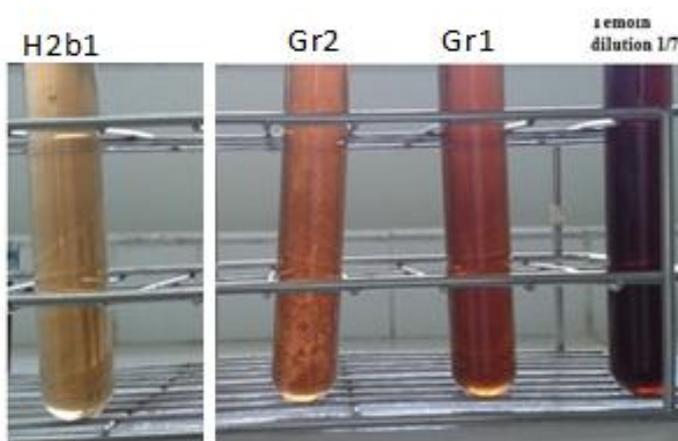


Figure 20 : Clarification des margines à la dilution 1/7 par H2b1, Gr2 et Gr1 à 37°C pendant 72 heures.

Par l'observation à l'œil nu des différent tubes, on constate une clarification (différente selon la souche) des margines après fermentation. Les meilleures souches dans ce sens sont H2b1 et Gr2. Afin de vérifier et de quantifier la dégradation des polyphénols présents dans notre échantillon des margines, le calcul du pourcentage de dégradation des margines brutes et diluées au 1/2 et 1/7 a été effectué dans le laboratoire de biotechnologie. Les résultats de l'épuration biologique des polyphénols sont présentés dans **le tableau 8**.

Tableau 8: Pourcentage d'élimination des polyphénols des margines brutes et diluées au 1/2 et 1/7 après la fermentation à 37°C pendant 72 heures.

Espèces \ Margines	Brute	Dilution 1/2	Dilution 1/7
H2b1	46 %	96 %	82 %
Gr2	24 %	50 %	70 %
Gr1	24 %	24 %	64 %

Le pourcentage de dégradation des polyphénols dans les margines brutes et diluées, est différent d'une souche à l'autre, mais la souche H2b1 reste la mieux classée en terme de capacité de l'épuration des polyphénols, caractère ajouté à l'aptitude de production de la biomasse et de l'éthanol à des températures élevées et à des pH acides, ce qui prouve la diversité enzymatique caractérisant chaque souche avec différents niveau d'expression et d'adaptation.

Nos résultats sont concordantes avec celles des chercheurs, qu'ont mentionnées que le taux d'abattement des composés phénoliques est augmenté par la dilution des margines. Assas et al. (2000) ont montré que la clarification des margines par *Geotrichum candidum* est réduite dans les margines concentrées. Martirani et al. (1996) ont reportés que la croissance de *Pleurotus ostreatus* est inhibée dans les margines qui sont plus concentré que 20%. Les résultats obtenus démontrent que les margines concentrées diminuent l'activité des microorganismes. Ceci pourrait être expliqué par une réduction de l'activité des microorganismes par un excès de substrat, surtout les polyphénols, mais pour nos souches, cette inhibition est faible, peut être due à l'adaptation des souches de levures avec les margines, précisément H2b1 puisque cette dernière est isolée à partir des eaux de végétation.

2. Dégradation de la charge organique par les souches de levures

Pour vérifier la dégradation des autres composés organiques, la mesure de la DCO après la culture est effectuée pour les souches H2b1, Gr2 et Gr1. Par la suite la comparaison avec la DCO initiale, nous permettra de mesurer d'une façon exacte le rendement de l'épuration biologique des souches performantes. Les valeurs de la DCO obtenues après la fermentation des margines à la dilution 1/7 par les souches de levures, ainsi que le rendement de l'épuration biologique sont présentés dans **le tableau 9**.

Tableau 9: DCO après la fermentation des margines par les souches de levures performantes durant 72 heures et le Rendement de l'épuration biologique.

Souche de levure	H2b1	Gr2	Gr1
DCO initiale (g O ₂ /l)	100	100	100
DCO finale (g O ₂ /l)	35.42	39.83	57.26
Rendement d'épuration (%)	64.58	60.17	42.74

L'analyse de ces résultats montre qu'en absence des micro-organismes, la matière organique exprimée en DCO ne subit pas de dégradation chimique. D'une façon plus pointue, la souche H2b1 possède une grande capacité d'épuration de la matière organique exprimée en DCO par rapport aux autres souches, la souche H2b1 permis un taux d'abattement de la DCO de 94.94% durant 72 heures ce qui est impossible dans la nature. Ce pourcentage est supérieur à celui démontré par d'autres chercheurs (Benitez et al., 1997 ; Fadil et al., 2003) qui ont choisi d'autres types de microorganismes en fermentation aérobie.

La comparaison des résultats de la réduction de DCO et le pourcentage d'élimination des polyphénols démontrent que plus la DCO diminue parallèlement le pourcentage de dégradation des composés phénolique augmente. Ceci nous permet de suggérer l'existence d'une corrélation entre le contenu en composés phénoliques et la DCO. Dans ce cadre une relation linéaire a été établie par (Aissam et al.,2003) entre la diminution des composés phénoliques et celle de la DCO avec un coefficient de corrélation très significatif variant entre 0,97 et 0,98. En effet, plusieurs auteurs ont signalé cette corrélation (Sayadi et Ellouz, 1992 ; Vinciguerra et al., 1995 ; Zenjari et al., 1999).

Pour la DBO5 finale, on constate une diminution importante après le traitement des margines présentent la dilution 1/7 par la levure H2b1 dans le délai de 72 heures et à 37 °C. Le résultat obtenu est présenté dans **le tableau 10**.

Tableau 10: DBO5 obtenu après le traitement des margines par H2b1 durant 72 heures.

Souche de levure	H2b1
DBO5 initiale (g O₂/l)	23.5
DBO5 finale (mg O₂/l)	154
Rendement d'épuration (%)	99.34

Par ailleurs, en ce qui concerne la DBO5, la souche H2b1 a un rendement d'épuration très important qui atteint 99.90%, il dégrade l'effluent des margines qui contient une charge organique égale à 28 g/l en DBO5 avant la fermentation assurée par H2b1. Le point le plus important qui caractérise ce résultat se manifeste dans le pourcentage d'abattement important obtenu par la souche H2b1, la valeur finale de DBO5 est proche à la concentration exigé par le **(Décret n° 2-04-553 du 13 hija 1425 (24 janvier 2005) : les déversements de l'industrie ne doivent pas dépasser 120 mg O₂/l en DBO5, en ce qui concerne la DCO elle ne doit pas**

être supérieure à 250 mg O₂/l, ce qui exige un autre traitement à l'effluent fermenté par la souche H2b1 en se basant sur ce Décret marocain. L'ensemble des résultats obtenus révèle l'importance de nos souches dans le traitement des margines.

Donc, tous les micro-organismes étudiés sont capables de croître sur les margines. Cette croissance se manifeste par la production de biomasse et la diminution de la charge organique. La dégradation de la matière organique est parallèle à celle des composés phénoliques.

IV) Cinétique de fermentation sur Margines et YPS

L'étude de la cinétique qui se fait dans un grand volume par rapport les essais précédents, ce qui facilite la compréhension du comportement des levures au niveau industriel. D'un côté, la connaissance de la vitesse de fermentation est indispensable pour la conception et la conduite optimale d'un procédé de fermentation. D'un autre côté l'effet de l'augmentation du volume reproche les conditions de culture au niveau pilote, alors ce travail permet de tracer la courbe de croissance pour le microorganisme qui nous intéresse, en se basant sur plusieurs paramètres utiles.

Les deux courbes (**figures 21 et 22**) montrent la cinétique de la production de la biomasse et de l'éthanol par la souche H2b1 cultivée sur les margines diluées en 1/7 et YPS à 15% de saccharose. L'incubation est faite à 37°C et sous agitation à 160 rpm. En parallèle, la mesure du pH et de l'absorbance au cours de la fermentation est nécessaire.

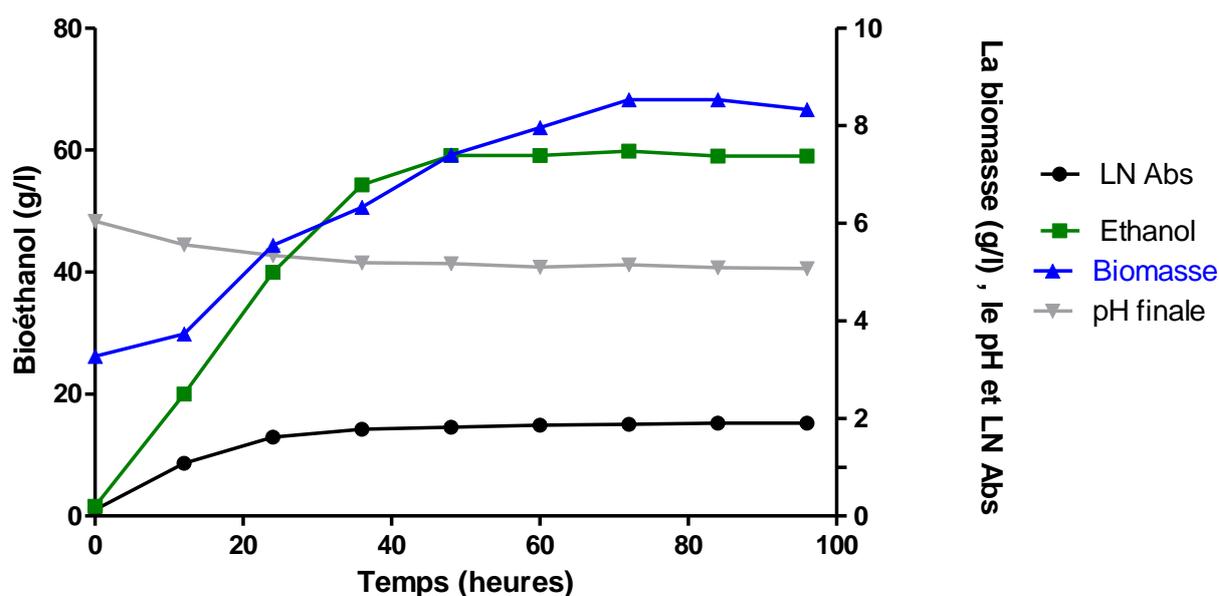


Figure 21: Cinétique de la fermentation sur YPS à 15% de saccharose par la souche H2b1 à 37°C.

Le rendement de la production de l'éthanol à partir du milieu YPS à 15% de saccharose est élevé, la concentration finale en bioéthanol atteint 60 g/l durant 48 heures, mais la concentration de la biomasse est toujours faible par rapport du bioéthanol, car elle ne dépasse pas 7.4 g de cellules sèches /l, donc le rendement $Y_{P/X}$ de l'éthanol produit par unité de biomasse formée égale à 8.1 g/g. En ce qui concerne les phases de croissance, la phase exponentielle commence dès le départ, c'est logique car l'inoculum ensemencé est obtenu après une pré culture fraîche et concentrée provenant du même milieu, ainsi le suivi de la concentration du biomasse et de l'absorbance dès la phase initiale jusqu'à la phase finale de fermentation démontrent une bonne concordance du point de vue mesure de croissance des cellules de levures, c'est-à-dire les deux paramètres (absorbance et croissance ont la même tendance). En ce qui concerne le pH, au fur et à mesure que la fermentation se développe dans le temps le pH diminue, mais d'une façon un peu lente sur YPS 15%.

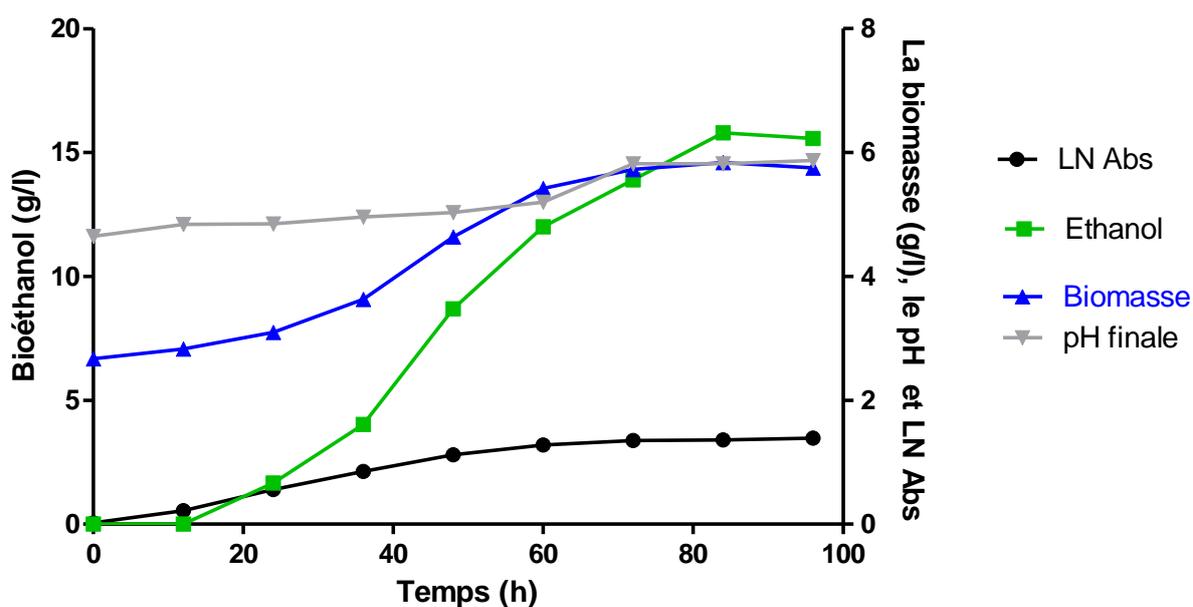


Figure 22: Cinétique de la fermentation des margines par la souche H2b1 à 37°C.

La figure 21 et 22 montre que l'allure de la courbe de croissance sur les margines est similaire à celle obtenue sur le milieu YPS à 15% de saccharose. La différence réside seulement pour le pH, ce qui est normal car le pH initial des deux milieux est différent, ainsi la composition des milieux est largement différente. D'autre part on observe une phase d'adaptation qui dure 18 heures avant d'entrer dans la phase exponentielle, ce qui est tout à fait conforme avec la nature du milieu toxique. D'après le graphe ci-dessus la croissance de la levure est associée à la production du bioéthanol provenant de la fermentation des margines

diluées en 1/7, autrement dit la production et la croissance microbienne sont concomitantes alors le bioéthanol est un métabolite primaire pour la souche H2b1, cultivés sur les deux milieux. Ce résultat est en concordance avec celui obtenu par (Napatchanok et al., 2012). Ces auteurs ont étudié la cinétique de la production de l'agro éthanol à partir l'hydrolysats d'amidon par la levure *pichia Kudriavzevii*.

D'un autre côté, la quantité produite de la biomasse est largement inférieure à celle du bioéthanol formé dès la phase exponentielle, puisqu'elle correspond à un potentiel de multiplication et de synthèse considérable, c'est-à-dire la voie de synthèse empruntée par notre souche est la production de l'éthanol, avec une quantité maximale de ce dernier qui atteint 16 g/l durant 84 heures de fermentation sur les margines, la productivité est faible en comparaison avec milieu YPS, mais la formation de la masse cellulaire ne dépasse pas 6g/l durant 84 heures, alors que sur YPS elle atteint 8.5 g/l.

Ceci nous laisse déduire que pour avoir un rendement maximal en bioéthanol il faut 84 heures de fermentation sur les margines. D'un autre côté, le rendement biomasse-produit ($Y_{P/X} = 2.83$ g biomasses produit /g éthanol formé) est moyen sur ce polluant en comparaison avec les autres études (Farooq et al 2001) qui ont fermenté l'épi du maïs (substrat lignocellulosique) par *Candida tropicalise*. Alors le prétraitement de ces déchets est nécessaire (Rajoka et Malik 1984).

Au cours de la cinétique, le pH marque une augmentation légère surtout dans la phase exponentielle. Cette élévation a été également observée par plusieurs auteurs (Fountoulakis et al., 2002 ; Fadil et al., 2003). Nous pensons que la phase de stabilisation du pH correspond à la phase stationnaire de la souche de levure puisque pendant cette période, il n'y a pas de production de la biomasse.

B. Lactosérum

I. Evaluation de L'efficacité de fermentation sur milieu YPS et lactosérum des souches sélectionnées

1. Production de la biomasse

La croissance de la biomasse cellulaire renseigne sur l'aptitude d'un milieu de culture à fournir les éléments nutritifs pour le développement des constituants cellulaires. Le lactosérum comme substrat joue deux rôles dans le processus global de transformation microbienne. Le premier est de fournir l'énergie nécessaire aux réactions de synthèse et de maintenance, le second est de servir à l'édification des composants cellulaires, bien sûr dans des conditions de culture bien définie. Par conséquent, l'étude de l'impact du petit lait sur la multiplication des cellules de levures présente un point important. **Les histogrammes (figures 23 et 24)** présentent les quantités de biomasse produites en (g/l) à partir du lactosérum par les trois souches de levures sélectionnées à trois températures différentes.

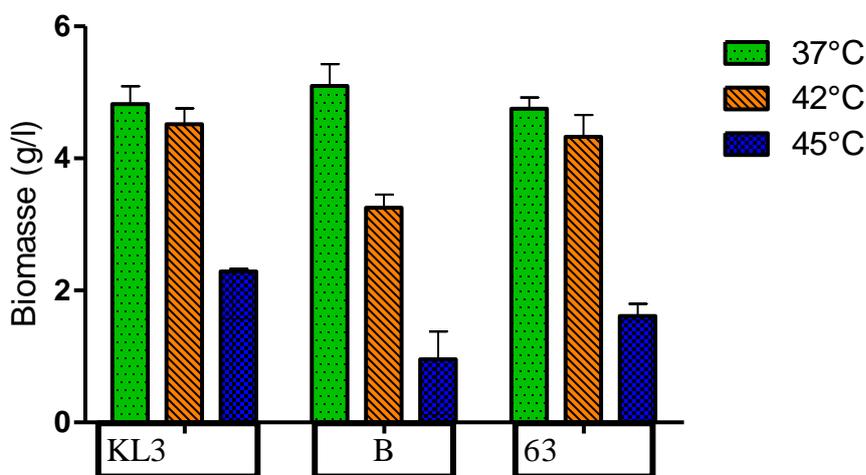


Figure 23: Production de biomasse par les souches de levures KL3, B et 63 à partir YPS à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures (n=3).

La production de la biomasse (g/l) sur YPS à 15% de saccharose s'effectue pour l'ensemble des températures. Même à 45 °C, la production continue pour les souches KL3, B et 63, ainsi la souche KL3 isolée à partir du lactosérum possède un potentiel de production intéressant en comparaison avec les autres souches de levures. Un point important à signaler, est que la diminution de la formation de la masse cellulaire pour KL3 ne dépasse pas 10% pour des températures de 37 à 42°C, sachant que la température optimale de croissance de cette souche est 30°C.

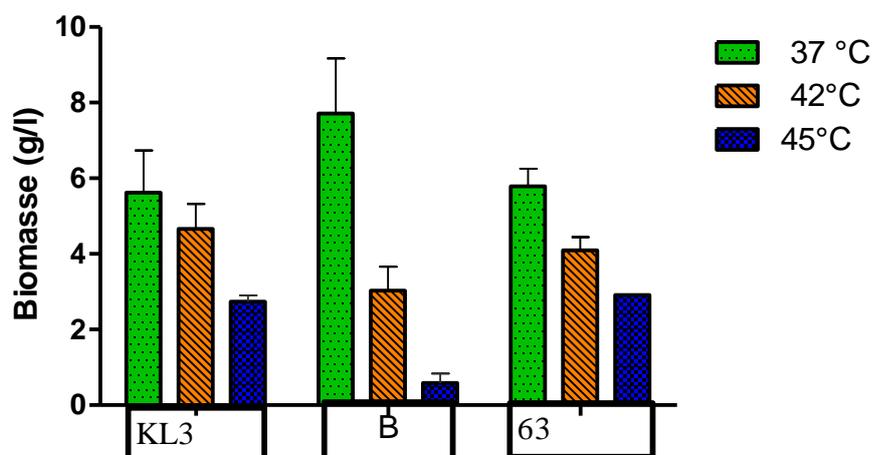


Figure 24 : Production de biomasse par les souches de levures KL3, B et 63 à partir lactosérum protéiné à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures (n=3).

La tendance de la formation de la biomasse sur le lactosérum protéiné remarquée dans la **figure 24** est presque la même que la fermentation sur YPS à 15% de saccharose. Dans les deux cas la concentration maximale en biomasse atteint 5 g/l en moyenne, ainsi la souche KL3 présente la plus grande capacité de production de la biomasse malgré l'augmentation de la température.

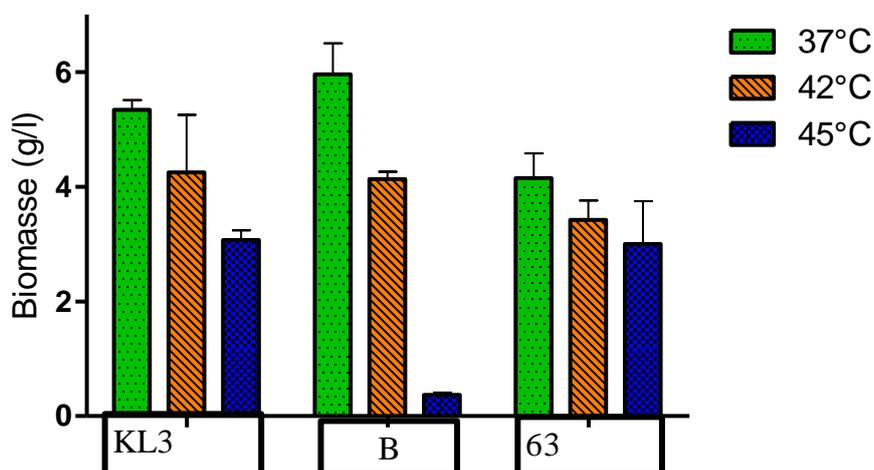


Figure 25 : Production de la biomasse par les souches de levures KL3, B et 63 à partir le lactosérum dé protéiné à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures (n=3).

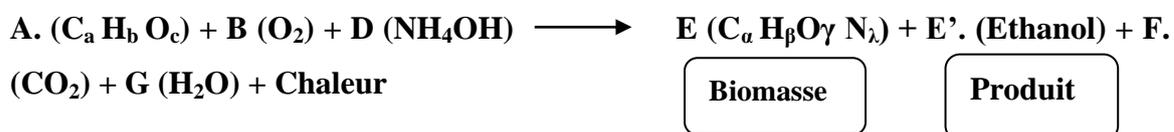
Si on garde les mêmes conditions précédentes à l'exception du changement du lactosérum protéiné par celui qui est dé protéiné (résultats présentés dans la **figure 25**), aucun effet n'est aperçu sur la production de la biomasse cellulaire. Autrement dit, les protéines éliminées par la température ne possèdent aucune influence sur la synthèse des cellules. Ainsi, la formation

de la masse cellulaire est presque la même dans le lactosérum et YPS comme milieu de laboratoire complet, donc l'avantage remarqué : c'est que le lactosérum présente un vrai milieu de croissance pour les souches KL3, B et 63. Notons que la souche thermotolérante isolée durant ces essais est KL3.

2. Formation du bioéthanol en aérobie

L'évaluation de la production du bioéthanol trouve sa justification dans l'objectif global de notre étude, la production de la bioénergie renouvelable avec un rendement plus élevé par rapport aux autres procédés. La formation du bioéthanol à travers la fermentation du lactosérum par les souches de levures (surtout une part de l'éthanol synthétisé) contient les alcools supérieurs et grâce de leur aspect huileux non miscible à l'eau pourront constituer un excellent adjuvant de solubilisation d'éthanol dans l'essence -alcool carburant- (Larpen et al 1990). Il est en effet très rare que la biomasse cellulaire soit le seul produit formé et la croissance microbienne s'accompagne fréquemment de la fabrication de un ou plusieurs produits.

Lorsque la croissance microbienne s'accompagne de la production de un ou plusieurs métabolites, la réaction globale peut être présentée dans la réaction suivante :



Avec $C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\lambda$ est la formule brute correspondant à la biomasse. Cette équation est utilisable pour évaluer les quantités d'azote et d'oxygène à fournir, lorsqu'on connaît la nature exacte des produits formés (Humphery, 1998).

L'étude de la formation du bioéthanol par la culture des souches de levure sur le lactosérum protéiné/dé protéine et YPS à 15% de saccharose, à différents températures, sont reportés dans **les figures 26 et 27**:

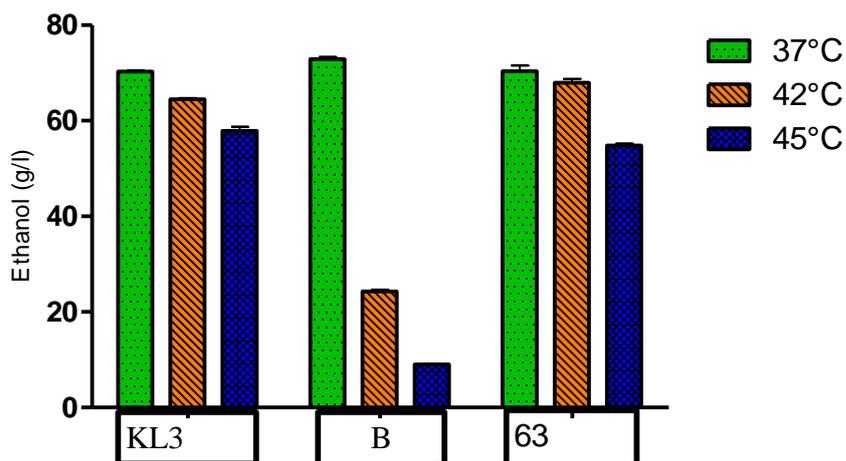


Figure 26: Production de bioéthanol par les souches de levures KL3, B et 63 à partir YPS à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures (n=3).

D'après la **figure 26**, nous constatons que le bioéthanol est synthétisé avec une grande quantité sur YPS, et pour les différents températures chez les souches KL3 et 63, mais une faible production est enregistrée chez la souche B. En plus les températures 45 et 42 °C n'affectent pas cette production, on observe seulement une réduction inférieure à 12% allant d'une température à l'autre chez KL3.

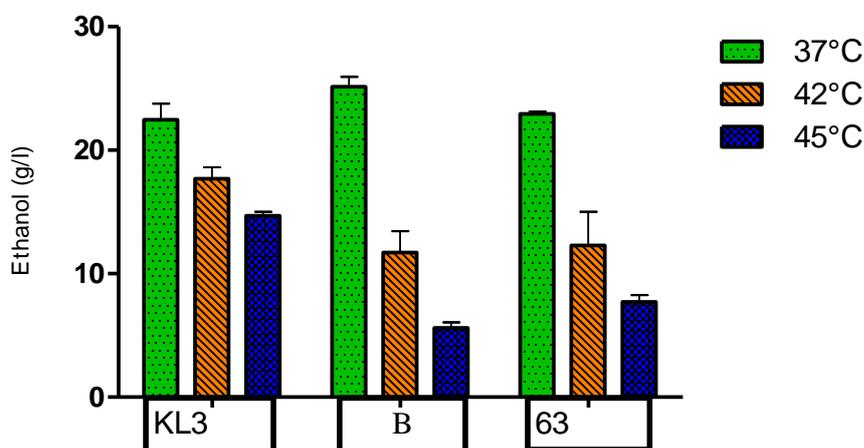


Figure 27: Quantités d'éthanol produites par les souches de levures KL3, B et 63 après la fermentation sur lactosérum protéiné à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures (n=3).

Malgré le changement du milieu YPS par le lactosérum protéiné (résultats présentés dans **figure 27**) la souche KL3 présente la production la plus intéressante en éthanol. L'augmentation de la température n'agit pas d'une façon significative sur la synthèse surtout pour cette souche thermotolérante.

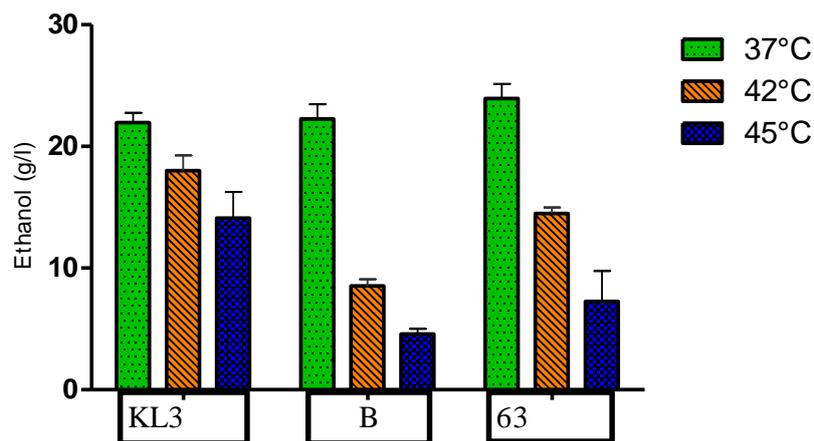


Figure 28: Quantités d'éthanol produites par les souches de levures KL3, B et 63 après fermentation sur lactosérum déprotéiné à 37°C, 42°C et 45°C durant 72 heures (n=3).

D'après le **graphe 28**, la production du bioéthanol enregistre la même variation dans le lactosérum protéiné et déprotéiné à 37°C, 42 et 45°C. D'autre part, la souche KL3 reste la souche thermo tolérante qui synthétise l'éthanol avec un rendement intéressant. La production maximale atteint en moyenne 22g/l durant 72 heures.

L'ensemble des résultats obtenus ont révélés que la production est plus intense dans le milieu YPS à 15% de saccharose en comparaison avec les deux autres milieux de lactosérum, ce qui prouve que les souches de levures possèdent l'activité invertase. Elle est maximale pour la souche KL3. D'autre part, les petits laits (protéiné et déprotéiné) ont le même effet sur la fermentation alcoolique, alors ce projet peut être exploité dans les deux volets, récupération de bioéthanol et des protéines du petit lait. Notons que le lactosérum sans protéine est le plus utilisé dans l'industrie et par plusieurs chercheurs pour la fermentation alcoolique sur ce milieu après la concentration du lactose (Fukuhara et al., 2006 ; Pedro et al., 2010).

Aussi les conditions de culture influencent d'une façon similaire sur la productivité du bioéthanol et de la biomasse avec une quantité plus élevée pour le premier (la même chose pour les souches H2b1, Gr2 et Gr1 sur les margines). Ce phénomène est expliqué par l'orientation du métabolisme vers la synthèse du produit (éthanol), précisément pour KL3 qui présente la souche choisie pour arriver à une rentabilité de production intéressante. Sachant que l'éthanol synthétisé provient du métabolisme des sucres simples, et que le lactosérum contient un taux élevé de lactose, sa concentration atteint 74 g/l (J.L. BURGAUD 1969), alors la souche KL3 possède l'enzyme β -galactosidase avec une grande expression par rapport aux autres souches. Cet enzyme dégrade le lactose en galactose et glucose, enfin ce dernier est

facile à métaboliser en éthanol selon l'équation de Gay Lussac : $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$.

D'un autre côté, les quantités formées de la biomasse et du bioéthanol par la fermentation sur le lactosérum sont un peu supérieures à celles obtenues dans les margines. En chiffre la quantité de la biomasse maximale dans les margines est de 3.5g/l produite durant 72 heures de fermentation. Concernant le lactosérum la concentration de la masse cellulaire produite atteint 5.4 g/l. Dans les essais le bioéthanol produit par fermentation atteint 17 g/l dans les margines et 22 g/l obtenus à partir du petit lait durant 72 heures. La recherche bibliographique démontre qu'il n'existe aucun résultat dans la littérature concernant la production du bioéthanol à partir des margines. A l'exception d'une étude faite par (Hiba et al, 2013) à partir les grignons déjà prétraités par l'acide sulfurique puis hydrolysés par cellulase et traités par le charbon actif dans le laboratoire, avec une production de l'éthanol qui ne dépasse pas 3g/100 g des grignons. Donc nous sommes les premiers qui ont étudié la fermentation alcoolique des margines par les souches thermotolérantes de levures.

En ce qui concerne la production du bioéthanol à partir de la fermentation sur le lactosérum, notre résultat est concordant avec l'étude élaborée par (Janssens et al., 1983) qui a reporté une production qui atteint 23 g d'éthanol /l obtenu par la fermentation de lactosérum déprotéiné assurée par la levure *Kluyveromyces fragilis*.

3. Changement de pH en avant et aval de la fermentation alcoolique

L'effet du pH sur l'ensemble de l'activité cellulaire est également très connu et se traduit par un phénomène d'allure comparable à celle de la température. La plupart des microorganismes actifs dans l'intervalle de pH compris entre 3 et 4 ce qui nécessite un contrôle rigoureux de ce paramètre.

Les valeurs mesurées de pH initial et final dans les trois milieux à différent températures en avant et post fermentation, sont montrées par **les figures 29, 30 et 31.**

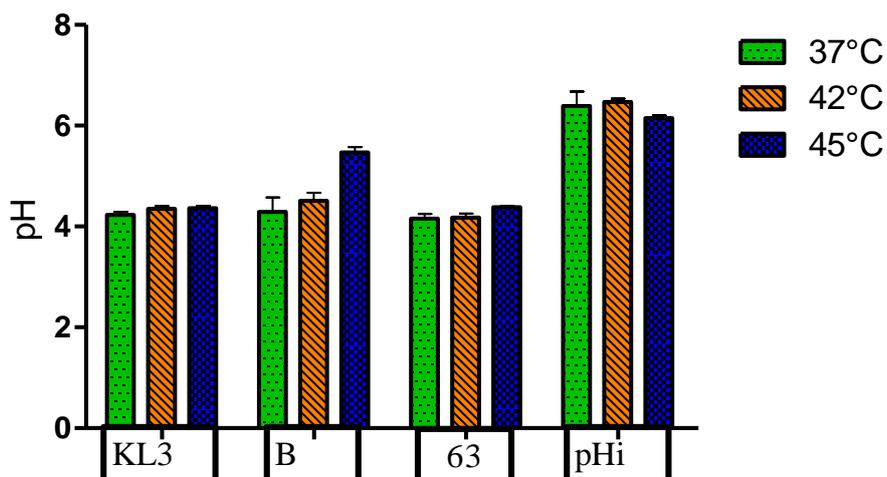


Figure 29: Variations du pH après fermentation sur milieu YPS par les souches de levures KL3, B , 63 à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures (n=3).

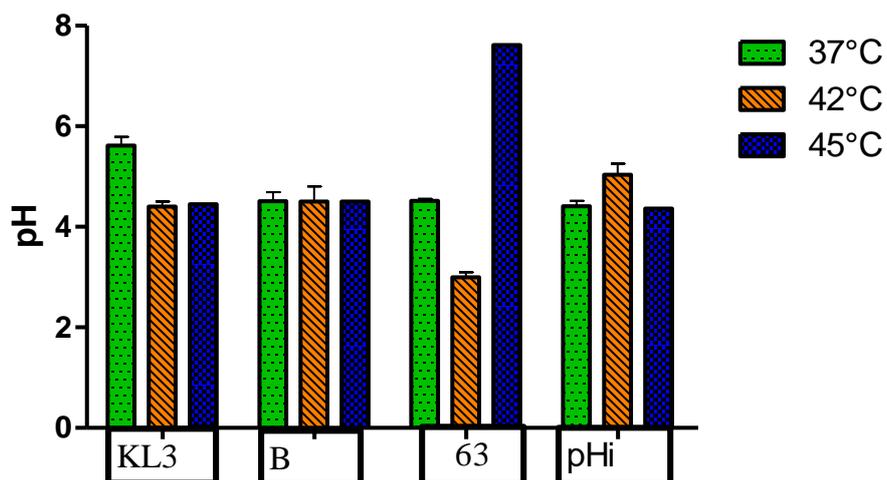


Figure 30: Variations du pH après la fermentation sur lactosérum protéiné par les souches de levures KL3, B , 63 à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures (n=3).

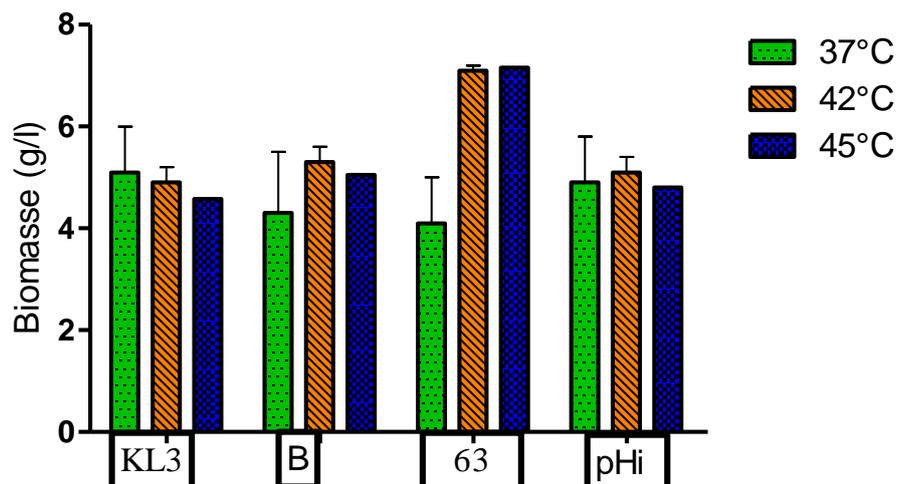


Figure 31: Variations du pH après fermentation sur lactosérum déprotéiné par les souches de levures KL3, B, 63 à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures (n=3).

Le pH du milieu lactosérum protéiné est proche de ceux du lactosérum déprotéiné avant et après la culture. On observe que le pH diminue d'une façon moyennement forte après la fermentation dans YPS, à cause du pH initial qui égal à 6.5, mais le pH final marque une légère variation dans le petit lait déprotéiné et protéiné par rapport au pH initial pour toutes les températures et les souches. En plus ce paramètre par rapport à ces dernières reste presque le même ce qui prouve d'un côté que l'élimination des protéines n'a aucun effet sur le pH de ces déchets en avant et en aval de la fermentation et d'autre côté que le pH optimum de l'activité de ces levures est compris entre 4 et 5.

Ce résultat est conforme à celui obtenu par (Ghaly et al., 1992). En effet, les auteurs ont reporté que la croissance sur lactosérum de pH 4 à 5 est nécessaire pour assurer la croissance et la survie des cellules de levures. Le développement de ces souches dans les conditions optimums citées présente l'avantage d'éviter au maximum la contamination microbienne, ce qui a été prouvé par (Van Uden, 1984) dans une étude où il démontre que la température de 40°C et seulement 3% de l'éthanol sont suffisants pour exercer l'inhibition. Le fait de la synthèse d'éthanol implique l'inhibition de la production des acides organiques mixtes, donc on évite une acidification forte des milieux de culture utilisés.

• Conclusion et perspectives

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les margines de Fès sont plus chargées en matière organique exprimée en DCO par rapport au lactosérum, ce qui nécessite le choix du microorganisme et le procédé de (traitement / valorisation) le plus performant dans le traitement des margines en comparaison avec lactosérum. Selon les premiers essais, il a été trouvé l'existence de deux souches performantes dans la fermentation des effluents industriels (lactosérum protéiné, dé protéiné et margines), les souches de levures qui occupent cette fonction sont KL3 sur le lactosérum sous deux formes et H2b1 sur les margines. Ce criblage a été appliqué sur six souches (KL3, B, 63 sur le petit lait et H2b1, Gr2, Gr1 sur l'eau de végétation).

En relation avec le premier volet de ce travail, les margines sont plus toxiques que le lactosérum en vue la nature des substances qui composent chaque sous-produits. C'est pour cette raison qu'on s'intéresse plus à étudier la fermentation sur les margines, alors que l'étude de la cinétique de croissance sur les margines a été réalisée pour avoir une idée claire sur le comportement de la souche performante H2b1 dans ce milieu très toxique en comparaison avec le milieu de laboratoire. Comme conséquence, la forme similaire des courbes de croissance de notre souche de levure sur chaque milieu (YPS et Margines) démontre l'adaptation de la souche H2b1 avec les margines. Les graphes obtenus démontrent que la production de l'éthanol est associée à la croissance cellulaire, d'un côté ce qui présente l'avantage de produire le bioéthanol dans un temps court. La souche H2b1 a permis d'avoir un rendement maximal de synthèse de l'éthanol et de masse cellulaire au bout de 80 heures. D'un autre côté ceci permet d'obtenir deux produits au même temps (bioéthanol et biomasse) exploitables dans l'industrie.

Les résultats montrent également que la souche H2b1 possède des propriétés exceptionnelles : la capacité de dégradation des polyphénols existants dans les margines caractérisées par une forte phytotoxicité, précisément la souche H2b1 a permis d'obtenir un taux d'élimination des phénols totaux qui atteint 82%, et la biodégradation de la charge organiques exprimé en DCO et DBO5 avec un rendement très important (dépassant 90%) et la possibilité de croissance dans un pH optimum pour la souche compris entre 4.5 et 5, ce qui donne l'avantage d'éviter la contamination au cours de la fermentation à l'échelle du laboratoire et industrielle. En effet, La souche H2b1 est capable de dégrader à la fois des

polymères et des composés organiques grâce à son équipement enzymatique très riche en enzymes jouant un rôle très important dans le métabolisme alternatif.

Dans le traitement des margines, le problème réside dans la méconnaissance des facteurs clés de la bio dépollution. Ainsi pour l'élaboration d'un procédé biotechnologique innovant, nous devons faire appel à des études biochimiques et génie génétique qui doivent se joindre au génie des procédés.

En ce qui concerne le lactosérum, le présent projet a été divisé en trois volets indépendants : la production des protéines, biomasse et bioéthanol au même temps par la souche de levure KL3. La production et la croissance optimale étaient à 37°C, ainsi la souche choisie est thermotolérante car il a une activité non négligeable dans les températures 42°C et 45° par rapport aux souches B et 63. Le pH optimal de croissance pour la souche KL3 est compris entre 4 et 5.

D'un autre côté, les quantités formées de la biomasse et du bioéthanol par la fermentation sur le lactosérum sont un peu supérieures à celles obtenues sur les margines. En chiffre la quantité de la biomasse maximale sur les margines est de 3.5g/l produite durant 72 heures de fermentation, concernant le lactosérum la concentration de la masse cellulaire produite atteint 5.4 g/l. Dans les essais le bioéthanol produit par fermentation atteint 17 g/l sur les margines et 22 g/l obtenu à partir du petit lait durant 72 heures. La recherche bibliographique démontre qu'il n'existe aucun résultat dans la littérature concernant la production du bioéthanol à partir des margines. A l'exception d'une étude faite par (Hiba et al, 2013) à partir les grignons déjà prétraités par l'acide sulfurique puis hydrolysés par cellulase et traités par le charbon actif dans le laboratoire, avec une production de l'éthanol qui ne dépasse pas 3g/100 g de grignon. Donc nous sommes les premiers qui ont étudié la fermentation alcoolique des margines par les souches thermotolérantes de levures.

En ce qui concerne le bioéthanol formé à partir de la fermentation sur le lactosérum, notre résultat est en bonne concordance avec l'étude élaborée par (Janssens et al 1983) qui a reporté une production qui atteint 23 g d'éthanol /l obtenu par la fermentation de lactosérum dé-protéiné assurée par la levure *Kluyveromyces fragilis* pendant 74 heures.

En bref l'aspect important de ce travail réside dans le choix des souches de levures thermotolérantes et le procédé avec leurs conditions optimums qui permettent d'assurer le traitement et la production de la valeur ajoutée à partir ces déchets de l'industrie oléicole et laitière, Alors par la suite ces effluents ne peuvent être considérés comme source de préjudice pour l'environnement mais des milieux de culture stables sont facilement exploitables. Donc notre projet a trois retombées : économiques, environnementale et sociale.

Ces résultats ouvrent la possibilité de l'immobilisation des cellules de levures, ainsi que l'induction métabolique de nos souches thermotolérantes de levures ce qui pourrait améliorer le rendement d'épuration de ces effluents issus de l'industrie agroalimentaire.

Il serait également envisageable d'étudier la capacité de la Co-culture des deux souches H2b1 et KL3 pour traiter les margines et le lactosérum.

D'autre part, le clonage des gènes métaboliques utiles et leurs expressions par les souches sélectionnées permettent d'améliorer le rendement du procédé de fermentation, surtout dans le cas de l'utilisation des promoteurs forts.

L'exploitation de notre nouveau procédé de fermentation à haute température à l'échelle industrielle, serait possible après l'étude des perspectives préalablement cité et la collaboration entre les entreprises et les établissements de l'état concernés.

• Références

Achkari-Begdouri A. (1994). Problématique des margines produites par les huileries et possibilités de valorisation et de traitement. Rapport destiné à la cellule d'études d'impact sur l'environnement, Ministère de l'intérieur, Royaume du Maroc).

Alexandre H., Rousseaux I., Charpentier C. (1994) Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. FEMS Microbiol. Lett. 124, 17-22.

Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribelarrea, J.L., Goma, G., Molina-Jouve, C. and Guillouet, S.E. (2004) Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63, 537-542.

Aldiguier, A.S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., Uribelarrea, J.L., Guillouet, S.E. and Molina-Jouve, C. (2004) Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. Bioprocess. Biosyst. Eng 26, 217-222.

Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S.E., Uribelarrea, J.L., Goma, G. and Benbadis, L. (2002) Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 67-72.

Al-Malah K., Azzam M.O.J., Abu-Lail N.I. (2000) Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. Separation and Purification Technology, 20, 225-234.

Anderson G., Donnelly T., Rippon G.M. (1977) Digestion anaerobia de aguas residuales industriales. Actas I. Congreso nacional de Química, Vigo., 549-565.

Antonacci R., Brunetti A., Rozzi A., Santori M. (1981) Trattamento anaerobico di acqua vegetazione di frantoio. I. Risultati preliminari. Ingegneria sanitaria, 6, 257-262.

Araba A., Benjelloun S., Hamama A., Hamimaz R., et Zahar M. (2001) les filières et marchés du lait et dérivés en Méditerranée, Option Méditerranéennes, Sér. B/n°32.

Asli A., Errachidi F., Bennisse G., Qatibi A., Errami M. (2005) Effect of cell immobilization on the treatment of olive mill wastewater by a total phenols, acetic acid and formic acid degrading bacterium strain. GRASAS Y ACEITES 56, 116-158.

Asther M., Labat M. (2001) Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. Food Chem; 75:501-7.

- Aveni A. (1984)** Biogaz from olive mill wastewater by anaerobic digestion. In anaerobic digestion and carbohydrate hydrolysis of waste. Eds Ferrero G.L., Ferranti M.P., Naveau H., Elsevier Applied Science, Barking.
- Baccioni L. (1981)** Riciclo delle acque e loro incenerimento : una soluzione per la depurazione delle acque dei frantoi. Riv. Ital. Sostanze Grasse, LVIII, 34-37.
- Balice V., Carrieri C., Carrieri G. (1997)** Trattamento chimico-fisico seguito dal biologico delle acque di vegetazione delle olive, Ricerca, 2, 50-53.
- Balice V., Boari G., Cera O., Abbaticchio P. (1982)** Indagine analitica sulle acque di vegetazione. Nota 1. Inquinamento 7, 49 – 53.
- Bazoti F., Gikas E., Skaltsounis A., Tsiropoulos A. (2006)** Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. Analytica Chimica Acta, 573–574, 258–266.)
- Beccari M., Bonemazzi F., Majone M., Riccardi C. (1996)** Interaction between acidogenesis in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents. Wat. Res., 30, 183-189.
- Beccari M., Majone M., Torrisi L. (1998)** Two reactor system with partial phase separation for anaerobic treatment of olive oil mill effluents. Wat. Sci. Tech., 38, 53-60.
- Beccari M., Majone M., Riccardi C., Savarese F., Torrisi L. (1999)** Integrated treatment of olive oil mill effluents : effect of chemical and physical pretreatment on anaerobic treatability. Wat. Sci. Tech., 40, 347-355.
- Benhaoun G., Lazzeri Yvette. (2007)** L'olivier en Méditerranée: du symbole à l'économie. édition L'harmattan, 33p.
- Ben yahia et Zein K (2003)** Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solution récemment développée. Contribution spéciale de sustainable business associates (Suisse) à Se sec.
- Bertin L., Majone M., Di Gioia D., Fava F. (2001)** Anaerobic fixed-phase biofilm reactor system for the degradation of the low-molecular weight aromatic compounds occurring in the effluents of anaerobic digestors treating olive mill wastewaters. J. Biotechnol., 87 (2), 161-77.
- Bleiker U., Guntern U., Rentsch W., Unternäher R., Hagenbuch S., Raaflaub M. (2002)** Transformation du lait dans les régions périphériques – Solutions pour la mise en valeur du petit-lait. Rapport de Projet du Groupement Suisse pour les régions de montagne e de la Fédération des Producteurs Suisses de Lait.
- Boari G., Brunetti A., Passino R., Rozzi A. (1984)** Anaerobic digestion of olive oil mill waste-waters. Agric. Wastes, 10, 161-175.

- Borja R., Martin A., Alonso V., Garcia A.I., Banks C.J. (1994)** Influence of different aerobic pre-treatment on the kinetic of anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Water Research*, 19, 489-495.
- Borja R., Alba J., Garrido S.E., Martinez L., Garcia M.P., Monteoliva M., Ramos- Borja R., Martin M.A., Banks C.J., Alonso V., Chica A. (1995)** Kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater at mesophilic and thermophilic temperatures. *Environ. Pollution*, 88, 13-18.
- Boskou G., Salta F.N., Chrysostomou S., Mylona A., Chiou A., Andrikopoulos N.K. (2006)** Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry* 94:558-564.
- Burgaud J (1969).** Les eaux residuaires dans l'industrie laitière. *Le Lait*, 49, 417-433.
- Cadillon M (1991)** la valorisation agronomique des margines, 3ème rencontre de l'Agence Régionale pour l'Environnement Provence Alpes Côte d'Azur.
- Cantarelli C., Montedero G. (1974)** Extraction des antioxydants naturels des olives. Etude expérimentale. Pp.84.
- Capasso., R., Evidente A., Scognamiglio F. (1992)** A simple thin layer chromatographic method to detect the main polyphenols occurring in olive oil vegetation waters. *Phytochem Anal*; 3:270–5.
- Casey,G.P. and IngledeW,W.M. (1986)** Ethanol tolerance in yeasts. *Crit. Rev. Microbiol.* 13, 219-280.
- Castillo-Rivera L.A. (1999)** Etude d'effluent difficilement biodégradable: Caractérisation et Traitement par procédés d'oxydation avancée (POA). Thèse de Doctorat. Université Aix-Marseille I, Marseille, France, 35-54.
- Chamrani C. (1994)** Etude et possibilités du traitement physico-chimique des margines des Huileries d'olive du Maroc, Mémoire d'ingénieur d'état. IAV, Rabat. Maroc.
- Celano G.,Smejkalova D., Spaccini R., Picco A (2008)** Interaction of three s-triazines with humic acids of different structure, *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 56, 7360-7366
- Chatzisyneon E., Xekoukoulotakis N., Mantzavinos D., (2009).** Determination of key operating conditions for the photocatalytic treatment of olive mill wastewaters. *Catal. Today* 144, 143-148.
- Cormenzana A. (1995)** Effect of aerobic pretreatment with *Aspergillus terreus* on the anaerobic digestion of olive-mill wastewater, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 22, 233-246.

- D'Annibale., Ricci M ., Quartino D., Federici F., Fenice M. (2004)** Panus tigrinus effeciently removes phenols, color and organic load from olive mill wastewater. Res. Microbiol. 155,596-603.
- De Haast J., Britz, T., Novello C., Verwey E. (1985).** Anaerobic digestion of deproteinated cheese whey. Journal of Dairy Research, 52, 457-467.
- Dien B., Cotta A., Jeffries T. (2003)** Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. Appl Microbiol Biotechnol; 63:258–66.
- Di Gioia D., Bertin L., Fava F., Marchetti L. (2001a)** Biodegradation of hydroxylated and methoxylated benzoic, phenylacetic and phenylpropenoic acids present in olive mill wastewaters by two bacterial strains. Res Microbiol., 152 (1), 83-93.
- Di Gioia D., Fava F., Bertin L., Marchetti L. (2001b)** Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill Wastewaters by two aerobic bacteria. Appl Microbiol Biotechnol., 55 (5), 619-26.
- Di-Giovacchino L. (1996).** Influence des systèmes d'extraction, sur la qualité de l'huile d'olive, Olivea, 63, 52-63.
- Diamadopoulos E., Samaras P., Sakellaropoulos G.P. (1992)** the effect of actived carbon Properties on the adsorption of toxic substances. Watt. Sci. Tech., 25, 153-160
- Dixon M., Douglas B (1989)** the inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms, 67, 109-136.
- Domingues L., Dantas M., Lima N., Teixeira J. (1999)** Continuous ethanol fermentation of lactose by a recombinant flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain. Biotechnol Bioeng,64,692–7.
- Ergüder T.H., Guven E., Demirer G.N. (2000)** anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors. Process Biochem., 36 (3) ,243-248.
- Ehaliotis C., Papadopoulou K., Kotsou M., Mari I.I., Balis C. (1999)** Adaptation and population dynamics of Azotobacter vinelandii during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. FEMS Microbiol Ecol., 30 (4), 301-311.
- Ercoli E., Ertola R. (1983)** SCP production from olive black water. Biotechnol. Lett., 7, 457-462.
- Fadil K., Chahlaoui A., Ouahbi A., Zaid A., Borja R. (2003)** Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. International biodeterioration & biodegradation, 51, 37-41.
- Farooq L, Mohammad I (2001)** Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts Bioresource Technology 77,57-63.

Francesco G.L. (1993) Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. *Olivae*, 47, 15-20.

Fountoulakis M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M.E., Aggelis G.G., Lyberatos G. (2002) Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.*, 36 (19), 4735-44.

Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1958) Caractéristiques et Elimination des eaux résiduelles des Usines à huile. 1ère Conférence Internationale des Techniciens oléicoles. 21-27, Mai, Tanger-Maroc. 5-12.

Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1981) Différentes utilisations des margines. Actes du Séminaire International sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). 93-110. Tunisie.

Fiestas Ros de Ursinos J.A., Leon G., Garcia B., Maestrojuan S (1986) Possibilidades de utilizacion del alpechin como fertilizante. Simposio Internacional. Sobre Valorizacion de los subproductos del olivar : alpechin y orujo. Marzo, Sevilla- Aspana. 5-6-7,321-330.

Fiestas Ros de Ursinos, J.A., Borja R. (1992) Use and treatment of olive mill wastewater : Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*, 2, 101-106.

Filidei S., Masciandro, G and Ceccanti. (2003) Anaerobic digestion of oil mill effluents: evaluation of wastewater the organic load and phytotoxicity reduction water, air and soil pollution, 145, 79-94.

Fiorentino F., Garofalo A., De Santi G., Bono., G.B.Giusto G.Norrito (2003) Spatio-temporel distribution of recruits (o group) of *Merluccius* and *Phycis blennoides* (Pisces ; Gadiformes) in the Strait of Sicily (Central Mediterranean). *Hydrobiologie* 503 :223-236.

Fountoulakis M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M.E., Aggelis G.G., Lyberatos G. (2002) Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.*, 36 (19), 4735-44.

Fukuhara H. Kluyveromyces lactis—a retrospective. FEMS Yeast Res (2006) Gancedo JM. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:334–61.

Gao C et Fleet G. (1988) The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata* 65, 405–409.

Ghaly A, Ben Hassan R, Mansour M. (1992) Effect of pH control on the growth and survival of *Kluyveromyces fragilis*. In: Cheese whey under aerobic condition. *Appl Biochem Biotechnol J*,33,219–35.

- Goncalves C, Pereira C, Belo I. (2010)** Comparison of batch and fed-batch lipase production from olive mill wastewater by *Yarrowia lipolytica* and *Candida cylindracea*. J Biotechnol ;150 S:S1–576. In Special Abstracts.
- Giulietti A.M., Ercoli E., Ertola R. (1984)** Purification and utilization of olive black water and distillery slops by microbial treatment. Acta Cient Venez 35, 76-86.
- Garrido E., Martinez L., Camacho F., Ramos A. (2002)** Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with *Aspergillus terreus*. Pro. Biochem., 37, 1169-1176.
- Hallsworth. E (1998)** Ethanol-induced water stress in yeast. J. Ferm. Bioeng. 85, 125-137.
- Heg Z., Aaron S., Michel B., Peter S. (2008)** Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. Bio resource Technology; 99:5078-84.
- Hiba A, Naim N, Carlos D, Ahmed T, Hassan A (2013)** Potential of bioethanol production from olive mill solid wastes., 152, 24–30.
- Humphery A (1998)** Shake Flask to Fermentor: What have we Learned. Biotechnol Prog 14,37.
- Hamdi M. (1993a)** Future prospects and constraints of olive mill waste waters use and treatment : A. Review. Bioprocess Engineering, 8, 209-214.
- Hamdi M. (1993b)** Thermoacidic precipitations of darkly coloured polyphénols of olive mill Waste waters, Environmental Technology, 14, 495-500.
- Hamdi M. (1993c)** Valorisation et épuration des effluents des huileries d'olives: l'utilité de la microbiologie industrielle. Olivae, 46, 20-24.
- Haagensen, F., Skiadas, I.V., Gavala, H.N., Ahring, B.K., (2009).** Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentrations. Biomass Bioeng. 33, 1643–1651.
- Jacques D. (1993)** Valorisation des sous-produits de l'industrie de transformation du lait. Cahier technique réalisé pour le Centre québécois de valorisation de la biomasse, Ste-Foy, Canada,24, 45-69.
- Jacquet V (1999)** France Agrimer d'après Déminéralisation par électrodialyse en présence d'un complexant application au lactosérum.
- Janssens J., Burris N., Woodward A., Bailey RB. (1983)** Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragilis*. Appl Environ Microbiol, 45,598–602.
- Jauragui G.M. (1982)** Energy production in the olive oil industry from biomethanisation of its effluents. Food Ind. Environ., 9, 163-172.

- J.P Larpent (1990)**, Biotechnologie des levures en fermentation alcoolique industrielle, page 367).
- Kahraman S., Yesilada O. (1999)** Effect of spent cotton stalks on color removal and chemical oxygen demand lowering in olive oil mill wastewater by white rot fungi. *Folia Microbiol.*, 6, 673-676.
- Khoufi S., Aloui F., Sayadi S (2006)**. Treatment of olive oil mill wastewater by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion. *Water Res.*, 40: 2007–2016.
- Koster I.W., Cramer A. (1980)** Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 403-409.
- Kissi M., Mountadar M., Assobhei O., Gargiulo E., Palmieri G., Giardina P., Sannia G. (2001)** Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 57 (1-2), 221-6.
- Lacomelli A. (2000)** olive mill waster & Sap adapted by Bacron contracting parties-work shop on agro-industry development in the coastal areas, with special focus on the olive oil industry-Beirut Lebanon,12,120-134
- Leao,C. and van Uden,N. (1982)** Effects of ethanol and other alkanes on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 2601-2604. 143.
- Leao,C. and van Uden,N. (1984)** Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 774, 43-48.
- Lesage L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot JC., Lorquin J., Delattre M., Simon JL., Leslie,S.B., Israeli,E., Lighthart,B., Crowe,J.H. and Crowe,L.M. (1995)** Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- Lettinga G., Van Velson A.F.M., Lobma S.W., de Zeeuw W., Klapwijk A. (1980)** Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especiallt for anaerobic treatment. *Biotech. Bioeng.*, 222, 699-734.
- Martin A., Borja R., Garcia I., Fiestas J.A. (1991)** Kinetics of methane production from olive mill wastewater. *Process. Biochem.*, 26, 101-107.
- Mébirouk M. (2002)** Rejets des huileries, développement d'un procédé intégré pour la biodégradation des polyphénols dans les margines .CMPP NEWS n°1.
- Mendia L., Procino L. (1964)** Studio sol trattamento delle acque di rificito dei frantvi oleari. Pro. ANDIS conference. Bologna, Italy,6, 12-17
- Morin A., Raymond Y., Cormier F. 1994.** Production of fatty-acid ethyl-esters by *Pseudomonas fragi* under conditions of gas stripping. *Process Biochemistry*, 29:437-441.

- Mouncif M., Tamoh S., Faid M., Achkari-Begdouri A. (1993)** A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste water in Morocco. *Grasas y Aceites*, 44, 335-338.
- Manahan SE (1994)** *Environnement chemistry*, 6ème Ed, USA, Lewis Publisher.
- Martirani L., Giardina P., Marzullo L., Sannia G. (1996)** Reduction of phenol content and Toxicity in olive mill wastewaters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water*.
- Nefzaoui A. (1987)** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. Séminaire sur l'économie de l'olivier. Tunis.
- Napatchanok Y ., Wichien Y .,Mumoru Y .,Savitree L. (2012)** Springer Science+Business Media Dordrecht, 103,577–588.
- Niaounnakis C., Halvadakis. (2003)** OMW management, Greece ISBN 960-402-123-0.
- Obied H., Allen M., Bedgood R. (2007).** Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food Chem Tox*;45:1238–48.
- Ogier C., (1999)** « Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique ». *Oil & Gas Science and Technology*. 54. 67 - 94.
- Onwulata C., Huth P. (2008).** *Whey processing, functionality and health benefits*. Ames: Blackwell Publishing (400 pp.)
- Pedro M., Guimarães J., Teixeira., Lucília D (2010)** Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey, *Biotechnology Advances* ,28 , 375–384.
- Pesta G., Meyer P., Russ W. (2007).** Utilization of whey and treatment of waste in the food industry,6, 11-19 .
- Patni, N., Pillai, G., Dwivedi, H., (2013).**Wheat as a promising substitute of corn for bioethanol production. *Proc. Eng.* 51, 355–362.
- Radoux,M. et Cadelli,D (1995)** . Epuration extensive des eaux usées des petites collectivités en zones rurales. *Smmarcelli-Biguglia*,7,45-52.
- Raghu N., Mohammad A., Nicholas J., Shona M., Eric L., Malek A (2015)** Bioconversion of paper mill sludge to bioethanol in the presence of accelerants or hydrogen peroxide pre-treatment, *revue, Bioresource Technology*,10,12-23.
- Rajoka, M.I, Malik, K.A., 1984.** Cellulase and hemicellulase production by *Cellulomonas avigena* NIAB441. *Biotechnol. Lett.* 6, 597-600.

- Ranalli A. (1991b)** the effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with Reference to Italian legislation. *Olivae*, 38, 19-34.
- Ranalli A. (1992)** Microbiological treatment of oil mill waste waters. *Grasas y Aceites*, 43, 16-19.
- Reimers ., Suarez G. (1983)** Posibilidades de tratamiento del alpechin por ultrafiltracion y osmosis inversa, *Quimicae Industria*, 273-274.
- Renzo C., Amirante P. (1988)** Trattamento di osmosi inversa ed ultrafiltrazione, In proc. Of Inter. Symp, on olive mill wastewater traetment. COI-FAO-APROL, Lecce, Italy.
- Robles A., Lucas R., De Cienfuegos G.A., Galvez A. (2000)** Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the *hyphomycete Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 484-490.
- Salvemini F. (1985)** Composizione chimica e valutazione biologica di un mangime ottenuto essicando tercamente le acque di vegetazione delle olive. *Riv. Delle Sostanze Grasse*, 112, 559-564.
- Salgueiro,S.P., Sa-Correia,I. and Novais,J.M. (1988)** Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae* : kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Appl. Environ. Microbiol* 54, 903-909.
- Sayadi S., Ellouz R. (1992)** Decolouration of olive mill wastewaters by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* involvement of the lignin-degrading system. *Appl. Micrbiol. Biotechnol.*, 37, 813-817.
- Sayadi S., Ellouz R. (1993)** Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters. *J. Chem. Biotechnol.*, 57, 141-146.
- Sayadi S., Ellouz R. (1995)** Role of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill waste-waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1098-1103.
- Sayadi S., Zorgani F., Ellouz R. (1996)** Decolorization of olive mill waste-waters by free and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* cultures. Effect of the high-molecular-weight polyphenols. *Appl Biochem Biotechnol.*, 56 (3), 265-76.
- Seabra RM, Andrade PB. (2005)** Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem* , 89,561–8.
- Shahidi F, Nacz M (2003)** Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL, USA:CRC Press; 21,37-53.

- Sienkiewicz T, Riedel CL. (1986)** Whey and whey utilization. WEB Fachbuchverlage: Leipzig Germany;
- Siso M (1996).** The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *BioresTechnol*,57, 1-11.
- Smithers GW. (2008)** Whey and whey proteins from 'gutter-to-gold'. *Int Dairy J*,18, 695-704.
- Swan,T.M. and Watson,K. (1999)** Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol. Lett.* 169, 191-197.
- Tsimidou M., G. Papadopoulos, D. Boskou. (1992)** Phenolic Compounds and Stability of Virgin Olive Oil. *Food Chem.* 45: 141-144.
- Taherzadeh MJ, Karimi K. (2008)** Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int J Mol Sci*,9, 21–51.
- TEBBOUCHE Latifa. (2012)** Centre de Développement des Energies Renouvelables.
- Ueno Y., Fukui H., Goto M. (2007)** Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste. *Environ Sci Technol* 2007; 41,1413-9.
- Van Uden N (1984)** Cardinal temperatures of yeast. In: Laskin AI, Lechevalier HHA (eds) *Handbook of microbiology*, vol 6. CRC, Boca Raton, pp 1–8.
- Vinciguerra V., D'Annibale A., Delle Monache G., Sermanni G.G. (1995)** Correlated effects during the bioconversion of waste olive waters by *lentinus edodes*. *Bioresource Technol.*, 51, 221-226.
- Vinha AF, Ferreres F, Silva BM, Valentão P, Gonc , alves A, Pereira JA, Oliveira MB, MB, Seabra RM, Andrade PB. (2005)** Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea L.*): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem*,89,561–8.
- Yang S, Silva E (1995).** Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *J Dairy Sci*; 78:2541–62.
- Yesilada O., Sik S., Sam M. (1998)** Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, 37-42.
- You K.M., Rosenfield C.L. and Knipple D.C. (2003)** Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol* 69, 1499-1503.

Zafar S, Owais M. (2006) Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem Eng J*, 27, 295–8.

Zenjari B., Hafidi M., El Hadrami Bailly J.P., Nejmeddine A. (1999) Traitement aérobie des effluents d'huilerie par les micro-organismes du sol. *Agrochimica*, 3, 5-6.

Zouari N., Ellouz R. (1996) Microbial consortia for the aerobic degradation of aromatic Compounds in olive oil mill effluent. *Ind. Microbiol.*, 3, 155-162.

Sommaire :

□ Introduction Générale	1
Objectifs :	8
Partie I : Revue Bibliographique	9
A) Margines.....	10
I) Caractérisation physico-chimique des margines	10
1. Les procédés de production de l'huile d'olive et les sous-produits associés.....	10
2. Propriétés physico-chimiques.....	12
3. Caractérisation microbiologique des margines.....	14
II) Impact des margines sur l'environnement	14
1. La Pollution des eaux	15
2. La Pollution des sols.....	15
3. La Pollution d'air et du paysage	16
III) Traitement des margines.....	16
1. Procédés physiques.....	16
2. Procédés chimiques	18
3. Procédés biologiques	19
IV) Les voies de valorisation des margines	22
1. Utilisation des margines comme fertilisant	22
2. Protéines d'organismes unicellulaires (POU)	23
3. Méthanisation des margines	23
4. Production des enzymes	24
5. Effet antioxydant des margines	24
V) Bioéthanol de deuxième génération.....	25
1. Production d'éthanol à partir la matière lignocellulosique via la voie biochimique	25
2. Effet de l'éthanol sur la cellule de levure	26
B. Lactosérum	27
I) Caractérisation physico-chimique du lactosérum.....	27
1. Procédé de production de petit lait	27
2. Type et composition du Lactosérum	28
II) Voies de la valorisation du Lactosérum	29
1. Production des protéines et du poudre de lait.....	29
2. Affouragement bovin.....	30
3. Valorisation énergétique.....	31
Partie II : Matériel et Méthodes.....	33

I) Procédures avant la fermentation en aérobie.....	34
1. Echantillonnage	34
2. Matériel biologique.....	34
3. Les milieux de culture	35
4. Evaluation de la charge organique des déchets agroindustriels	36
II) Procédures au cours et après la fermentation alcoolique	39
1. Procédé de fermentation à l'échelle laboratoire	39
2. Vérification de l'efficacité de la fermentation alcoolique	39
2. Optimisation de la concentration des margines	42
4. Cinétique de la fermentation sur Margines et YPS à 15% de saccharose	42
Résultats et Discussion.....	44
A) Margines	44
I) Evaluation de la charge organique des déchets agro-industriels.....	45
1. La charge organique des effluents	45
II. Vérification de l'efficacité de fermentation sur les milieux YPS et margines.....	46
1. Production de la biomasse	46
2. Synthèse de l'éthanol.....	47
3. Variation du pH avant et après la fermentation sur YPS et Margines.....	49
III. Optimisation de la concentration des margines	51
1. Effet de la dilution sur la production de la biomasse sur les margines.	51
2. Effet de la dilution sur la production de l'éthanol	52
IV. Bio remédiation des margines	54
1. Dégradation des polyphénols.....	54
2. Dégradation de la charge organique par les souches de levures.....	55
IV. Cinétique de fermentation sur Margines et YPS	57
B. Lactosérum	60
I. Evaluation de L'efficacité de fermentation sur milieu YPS et lactosérum des souches sélectionnées	60
1. Production de la biomasse	60
2. Formation du bioéthanol en aérobie	62
3. Changement de pH en avant et aval de la fermentation alcoolique.....	65
□ Conclusion et perspectives	68
□ Références	71

➤ **Liste des figures :**

Figure 1: Diagramme de traitement des olives par pression.	11
Figure 2: Procédé d'obtention de l'huile d'olive par le système continue.	12
Figure 3: La voie générale de la production de bioéthanol à partir la matière lignocellulosique	25
Figure 4: Procédé de production de fromage et petit lait).....	28
Figure 5: Quelques chemins de valorisation de lactosérum	30
Figure 6: étapes les principaux de la production de l'éthanol à partir le lactosérum.....	31
Figure 7: procédé biologique de production de méthane	32
Figure 8: Aspect des colonies de levures sur milieu YPG solide.	35
Figure 9: Principe de fonctionnement de l'appareil DBO5- mètre.....	38
Figure 10: procédé de fermentation en discontinu.	39
Figure 11: Principe de la hydro distillation.....	41
Figure 12: Production de la biomasse par les souches de levures H2b1, Gr2, Gr1 à partir du milieu YPS à 37°C, 42°C et 45°C pendant 48 heures.....	46
Figure 13: Production de biomasse par les souches de levures H2b1, Gr2, Gr1 à partir des margines de dilution 1/7 à 37°C, 42°C et 45°C durant 72 heures.....	47
Figure 14: Quantités d'éthanol produites par les souches de levures H2b1, Gr1, Gr2 après la fermentation pendant 48 heures sur YPS à 37°C, 42°C et 45°C.....	48
Figure 15: Quantités d'éthanol produites par les souches de levures H2b1, Gr1, Gr2 après la fermentation sur margines à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures	48
Figure 16: Variations du pH après la fermentation sur milieu YPS par les souches de levures H2b1, Gr1, Gr2 à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures.	50
Figure 17: Variations du pH après fermentation sur le milieu margine par les souches de levures H2b1, Gr1, Gr2 à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures.	50
Figure 18: Biomasse formé après la fermentation des margines bruts et à l'ensemble des dilutions par les souches de levures.	52
Figure 19: Bioéthanol produit par les levures à différentes dilutions des margines.	53
Figure 20: Clarification des margines à la dilution 1/7 par H2b1, Gr2 et Gr1 à 37°C pendant 72 heures.	54
Figure 21: Cinétique de la fermentation sur YPS à 15% de saccharose par la souche H2b1 à 37°C.....	57
Figure 22: Cinétique de fermentation des margines par la souche H2b1 à 37°C.	58

Figure 23: Production de biomasse par les souches de levures KL3, B et 63 à partir YPS à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures.	60
Figure 24: Production de biomasse par les souches de levures KL3, B et 63 à partir lactosérum protéiné à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures.	61
Figure 25: Production de biomasse par les souches de levures KL3, B et 63 à partir le lactosérum dé protéiné à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures.	61
Figure 26: Production de bioéthanol par les souches de levures KL3, B et 63 à partir YPS à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures.	63
Figure 27: Quantités d'éthanol produites par les souches de levures KL3, B et 63 après la fermentation sur lactosérum protéiné à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures.	63
Figure 28: Quantités d'éthanol produites par les souches de levures KL3, B et 63 après fermentation sur lactosérum dé protéiné à 37°C, 42°C et 45°C durant 72 heures.	64
Figure 29: Variations du pH après fermentation sur milieu YPS par les souches de levures KL3, B , 63 à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures.	66
Figure 30: Variations du pH après la fermentation sur lactosérum protéiné par les souches de levures KL3, B , 63 à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures.	66
Figure 31: Variations du pH après fermentation sur lactosérum dé protéiné par les souches de levures KL3, B , 63 à 37°C, 42°C et 45°C pendant 72 heures.	67

➤ **Liste des tableaux :**

Tableau 1: Concentration des composés phénoliques dans les margines	13
Tableau 2: Composition minérale des margines	14
Tableau 3: Utilisation des levures pour la production de POU	23
Tableau 4: Composition de lactosérum doux et acide	28
Tableau 5: Gamme de calibration de réfractomètre.....	41
Tableau 6: Relation entre le rapport DBO5/ DCO et la faisabilité de traitement	45
Tableau 7: DCO et DBO5 des margines et de lactosérum bruts avant le traitement.....	45
Tableau 8: Pourcentage d'élimination des polyphénols des margines bruts et dilués aux 1/2 et 1/7 après la fermentation à 37°C pendant 72 heures.	54
Tableau 9: DCO après la fermentation des margines par les souches de levures performantes durant 72 heures	55
Tableau 10: DBO5 obtenu après le traitement des margines par H2b1 durant 72 heures.	56