UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

2015-UYFM-LBMPT-0009

Doctorat en Science

T H ÈS E

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

L'Université Dr.Yahia Farès de Médéa
Spécialité : Génie des Procédés

Présentée par ;

Mme AHMEDI Afaf épouse FERGANI

CONCEPTION ET RÊALISATION D'UN BIORÊACTEUR À PEROXYDASE IMMOBILISÊE POUR LA RÊDUCTION DE LA POLLUTION PAR LES COLORANTS AZOÏQUES

Jury

Mr BADIS Abdelmalek	Professeur	USDS, Blida	Président de jury
Mr TALEB AHMED Mourad	Professeur	USTHB, Bab ezzouar	Examinateur
Mme CHERIFI Hakima	MCA	UDYF, Médéa	Examinatrice
Mr ABOUSEOUD Mahmoud	Professeur	UDYF, Médéa	Rapporteur

Laboratoire de Biomatériaux
et Phénomènes de Transport

THÈSE

Remerciements

Tout d'abord je remercie mon grand Dieu pour le courage et la volonté qu'il m'a donné pour achever mon travail.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le professeur ABOUSEOUD Mahmoud, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Tout d'abord, j'adresse mes respectueux remerciements à tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de participer à l'évaluation de mon travail. Je suis certaine de pouvoir compter sur leurs vastes connaissances et leur esprit critique constructif pour m'aider, par leurs commentaires et leurs discussions, à mieux comprendre certains problèmes rencontrés au cours de ce travail de recherche.

Je souhaite exprimer ma gratitude à Mr. BADIS Abdelmalek, Professeur à l'université de Blida pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Je remercie vivement Mr. TALEB AHMED Mourad, Professeur à l'université de Bab ezzouar et Mme CHERIFI Hakima, Maître de conférences à l'université de Médéa pour l'intérêt porté sur mes travaux et pour avoir accepter d'examiner cette thèse

Toute ma profonde gratitude va également vers Monsieur BOUDANA Djamel l'ancien directeur du Hall Technologie et Maitre de Conférences à l'université de Médéa, pour m'avoir accueillie au sein de ses laboratoires. Je voudrais également remercier toutes les ingénieurs de laboratoires de Hall Technologie. Un grand merci à Nassima, Amina Alikacem, Radia, Rachida, Amina Tifoura, Amel, Lila et Amina safachaouche pour leur collaboration, leur aide, leur amitié et les bons moments passés ensemble

Je remercie profondément Mr BAKIR EL TERKI Othman, ingénieur de laboratoire LBMPT, qui, m'a aidé énormément dans le côté informatique.

Mes profonds remerciements vont également à Monsieur BELKACEMI Abed, directeur de département de l'unité de VRAC et responsable du laboratoire de microbiologie au niveau de SAIDAL, pour la confiance qu'il m'a accepté dans le laboratoire, pour sa gentillesse et sa sympathie qu'il a toujours manifestée à mon égard.

Ces remerciements perdraient de leur sens si j'oubliais les doctorantes avec qui j'ai partagés les bureaux, couloirs ou labos du Hall Technologie. Merci à Farida, Khadidja, Sarah et Naila pour l'ambiance exceptionnelle qu'ils ont su créer. Je voudrais les remercier tout particulièrement de ses bonnes humeur, de ses optimisme, des échanges très intéressant à propos de « la vie et de la science ».

Pour le meilleur, c'est surtout une profonde pensée pour mon papa décédé, et qui aurait été fier de moi. Je voudrais exprimer à toute ma famille, et plus particulièrement à ma mère, ma profonde reconnaissance pour sa patiente et son réconfort dans les moments de doutes et de découragements, Merci également à mes sœurs et mes frères pour leur amour, leur soutien sans faille et à tout ce qu'ils ont pu m'apporter pour franchir les obstacles les plus difficiles. J'adresse aussi mes remerciements à mes beaux-parents, pour le soutien qu'ils m'ont apporté en toute circonstance.

Remerciements

Les mots me manquent pour remercier, à sa juste valeur, mon conjoint, Mohamed qui par sa présence, sa patience, son soutien moral et sa compréhension m'a permis d'aller au bout de ce manuscrit, Ne doute jamais de ta contribution dans l'accomplissement de ce travail.

Enfin, un immense merci à tous mes proches, pour leur soutien et leur patience. Je rends hommage et j'exprime ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Je dédie ce travail

à *la mémoire de mon père*

à *Ma chère mère*

à *tous mes frères* et *sœurs*

à *mon mari*

à mes beaux parents

à tous mes beaux frères et belles sœurs

à *toute la famille AHMEDI, FERGANI et DOUAKH*

à *tous mes amis*

et à *vous*

Résumé

الملخص

إزالة اللون بالطريقة الأنزيمية للصبغة ثنائي الأزو، أحمر الكونغو ، عن طريق إنزيم البيروكسيداز المستخلص من نبات اللفت "براسيكا رابا" بشكليه الحر والمثبت قد درست. البيروكسيداز المستخلص من اللفت والمنقى جزئيا ثبت في جسيمات كروية من ألجينات الكالسيوم وجرب لإزالة لون المحلول أحمر الكونغو. و أعطت التجارب المحققة لمختلف الشروط في وسط مغلق الظروف المثلى من اجل مردود وسرعة إزالة لون عاليين. للإنزيم المثبت نفس درجة الحموضة والحرارة مع الإنزيم الحر في 2.0 و40°م على التوالي. وكانت الظروف المثلى لإزالة اللون القصوى باستخدام الإنزيم الحر هي 50 ملغ/لترمن تركيز الصبغة، 0.05 مول/لتر من بيروكسيد الهيدروجين، و0.45 وحدة إنزيمية/ملل من النشاط الإنزيمي في غضون 10 دقائق .في حين، أعطت الجينات الكالسيوم المثبتة للبيروكسيداز إزالة قصوى للون في تركيز عال من الصبغة180 ملغ/لتر وضعيف من بيروكسيد الهيدروجين0.01 مول/لتر . تأثير بعض المركبات الكيماوية على إزالة الأحمر الكونغو بواسطة بيروكسيداز اللفت المنقى جزئيا كذلك قد درست. تمت إزالة أكثر من 97٪ و94٪ من احمر الكونغو بواسطة إنزيم البيروكسيداز الحر والمثبت على التوالي بعد ساعة من التفاعل في وسط مغلق تحت الظروف المثلى .

تم تحديد الثوابت الحيوية لنشاط البيروكسيداز في أوساط تجاربية مغلقة بواسطة الإنزيم الحر والمثبت، واستعملت لتصميم مفاعل حيوي ذو نوع "الدعامة الثابتة " ويحتوي على البيروكسيداز المثبت للمعالجة بطريقة مستمرة محلول أحمر الكونغو.في هذه الدراسة، تم تشغيل مفاعلين بالدعامة الثابتة ذات أبعاد مختلفة ولكن لهما نفس الحجم. الأول يبلغ قطره 3.5 سم وارتفاع 40 سم، والذي أعطى إزالة لون تقريبا كاملة أكثر من 96% من اجل تدفق 100ملل/ساعة، تركيز صبغة 100 ملغ/ل، بعد 12 يوما من تشغيله المستمر في حين المفاعل الحيوي الثاني ذو القطر 5 سم وارتفاع 20 سم، كان اقل فعالية و أعطى 87٪ من إزالة الأحمر الكونغو في نفس الظروف.

وأظهر تحليل النواتج المتحصل عليها من المعالجة الأنزيمية بواسطة الأشعة الفوق البنفسجية والمرئية وأطياف الأشعة تحت الحمراء انعدام المركبات المتبقية في المحلول المائي وراسب ذو طبيعة بوليميرية .وكشف فحص دراسات التسمم والتسمم النباتي أن طبيعة النواتج غير ضارة بالمقارنة مع الصبغ الأصلي .

الكلمات المفتاحية : آزو, مردود, إزالة اللون , بروكسيداز, تثبيت, مفاعل بالدعامة الثابتة, تسمم.

Résumé

La décoloration enzymatique d'un colorant diazoïque, le rouge Congo (RC), par la peroxydase extraite à partir de navet "*Brassica rapa*" sous forme libre et immobilisée a été étudiée. La peroxydase du navet partiellement purifié a été immobilisée par inclusion dans les billes d'alginate de calcium et utilisée pour la décoloration d'une solution aqueuse de RC. Des essais expérimentaux en mode batch menés sous différentes conditions ont permis la détermination des conditions optimales sous lesquelles le rendement et la vitesse de dégradation sont les plus élevées. Pour les deux formes d'enzyme, libre et immobilisée, le pH et la température optimale étaient respectivement 2 et 40°C. Par ailleurs, dans le cas de l'enzyme libre, l'efficacité maximale a été obtenue à des concentrations en colorant RC de 50 mg/L, à 0.05 M en peroxyde d'hydrogène et en activité enzymatique (0.45 UI/mL) pour une durée de contact de 10 min. Cependant, dans le cas de la peroxydase immobilisée par inclusion dans l'alginate de calcium l'efficacité maximale a été enregistrée pour une concentration élevé en RC de 180mg/L et à une concentration plus faible de peroxyde d'hydrogène de 0.01 M. L'effet de certains produits chimiques sur le traitement du RC par la peroxydase partiellement purifiée a été également étudié. Plus de 97% et 94% de RC a été respectivement éliminé par la peroxydase libre et immobilisée après 1 h de traitement dans un procédé discontinu sous les conditions optimales de dégradation.

Les modèles cinétiques établis sur la base des résultats obtenus, ont été utilisés pour le calcul de bioréacteur de laboratoire, de type « lit fixe » contenant la peroxydase immobilisée pour le traitement en continu d'une solution aqueuse de RC. Dans cette étude, deux bioréacteurs de volumes égaux ont été réalisés avec des dimensions différentes. Le premier avec un diamètre de 3,5 cm et une hauteur de 40 cm a donné une efficacité d'élimination de plus de 96% pour un débit d'alimentation de 100 mL/h et pour une concentration du colorant de 100mg/L pendant une durée de fonctionnement continue de 12 jours. Le deuxième bioréacteur ayant des dimensions de 5cm de diamètre et 20 cm de hauteur était moins performant sous les mêmes conditions avec un rendement d'élimination de 87% du RC.

L'analyse des sous-produits issue du traitement enzymatique par UV-Vis et spectroscopie IR montre l'absence des composés résiduels dans le surnageant et un précipité de nature polymérique. Les études de toxicité et de phytotoxicité ont révélé que les produits obtenus après la décoloration présentent moins de toxicité par rapport au colorant RC.

Mots clés : Azoïque, rendement, décoloration, peroxydase, immobilisation, réacteur à lit fixe, toxicité.

Résumé

Abstract:

Enzymatic discoloration of the diazo dye, Congo red (CR), by free and immobilized plant peroxidase from turnip "*Brassica rapa*" is investigated. Partially purified turnip peroxidase (TP) was immobilized by entrapment in spherical particles of calcium alginate and was assayed for the discoloration of aqueous CR solution. Experimental tests of different parameters which were carried out in batch process allowed the determination of optimal conditions under which the highest yield and rate of degradation were obtained. The immobilized enzyme had the same optimal pH and temperature as the soluble enzyme which were at pH 2.0 and 40 °C. The optimal conditions for maximum efficiency using free peroxidase were at 50 mg/l CR dye, 0.05 M hydrogen peroxide, and TP activity of 0.45UI/ml within 10 min of incubation time. Whereas, the alginate entrapped turnip peroxidase gave the maximal color removal at high dye concentration of 180 mg/L and low hydrogen peroxide concentration of 0.01 M. The effect of some chemical products on the treatment of CR by partially turnip peroxidase was also studied. More than 97% and 94% of CR was removed by free and immobilized TP respectively after 1 h of incubation in a batch process under optimal conditions.

Kinetic parameters were also obtained for the peroxidase activity and were used for a fixed bed bioreactor design containing the entrapped peroxidase in calcium-alginate beads. In this study, two bioreactors were operated with different dimensions but at same volume. The first with a diameter of 3.5 cm and 40 cm height, retained more than 96% Congo red removal efficiency when working at a flow rate of 100 mL/h, a concentration dye of 100 mg/L under continuous operating during 12 days. The second bioreactor with 5 cm diameter and 20 cm height was less performant. The elimination yield was estimated to 87% under the same conditions.

Analysis of the by-products of the enzymatic treatment by UV-Vis and Infrared spectroscopy showed no residual compounds in the aqueous phase and a precipitate of polymeric nature. Toxicity and phytotoxicity studies revealed lesser toxicity of treated solutions when compared to original dye.

Key Words: Azo, yield, discoloration, peroxidase, immobilization; fixed bed reactor, toxicity

REMERCIEMENTS
DÉDICACE
RÉSUME
TABLE DES MATIÈRES
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUX
LISTE DES ABBRÉVIATIONS

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

PARTIE A : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. Problématique Environnementale: Pollution par les colorants azoïques

Introduction 4
I.1. LES COLORANTS 5
I.1.1. Définition des colorants 5
I.1.2. Structure des colorants 5
I.1.3. Classification des colorants 6
I.2. LES COLORANTS AZOÏQUES 8
I.2.1. Définition et utilisation 8
I.2.2. Préparation des colorants azoïques 8
I.2.3. Classification des colorants azoïques : 10
I.2.3.1. Classification chimique 10
I.2.3.2. Classification tinctoriale 11
I.3. IMPACTS SUR L'ENVIRONNEMENT DE LA POLLUTION ENGENDRÉE PAR LES COLORANTS AZOÏQUES 14
I.3.1. Evaluation de la pollution 14
I.3.2. Législation et impact sur l'environnement 15
I.3.3. Dangers à court terme : 16
I.3.4. Dangers à long terme : 17
I.3.5. Mutagénicité / Carcinogénicité 17
I.4. PRINCIPALES MÉTHODES DE DÉCOLORATION 18
I.4.1. Méthodes physiques : 19
I.4.1.1. Filtration sur membrane 19
I.4.1.2. Adsorption : 19
I.4.2. Méthodes chimiques 19
I.4.2.1. Procédés d'oxydation avancée (POA) 20
I.4.2.1.1. Réaction de Fenton (H_2O_2/Fe^{2+}) : 20
I.4.2.1.2. Ozonation : 20
I.4.2.1.3. Chloration 21
I.4.2.1.4. Photolyse et photocatalyse : 21
I.4.2.2. Procédés électrochimiques 22
I.4.3. Méthodes microbiologiques 22
I.4.4. Méthodes enzymatiques 23
I.4.5. Résumé comparatif des procédés de traitement des colorants 24
Conclusion 27

Chapitre II. Élimination des colorants azoïques dans des bioréacteurs à peroxydase immobilisée

Introduction 28
II.1. LA PEROXYDASE....28
II.1.1. Définition et constitution de la peroxydase....28
II.1.2. Historique....28
II.1.3. Structure chimique de la peroxydase 28
II.1.4. Famille des peroxydases 29
II.1.5. Mécanisme réactionnel de la peroxydase....31
II.1.6. Application de la peroxydase dans la dégradation des colorants 32
II.2. LES ENZYMES ET LA CINETIQUE ENZYMATIQUE 35
II.2.1. Réactions enzymatiques à un seul substrat : 35
II.2.2. Inhibition par excès du substrat 37
II.2.3. Réactions enzymatique à deux substrats....38
II.3. IMMOBILISATION DES ENZYMES 39
II.3.1. Définition et caractéristiques de l'immobilisation 39
II.3.2. Méthodes d'immobilisation des enzymes....40
II.3.2.1. Méthodes irréversibles 40
II.3.2.2. Méthodes réversibles....41
II.3.3. Limitations diffusionnelles 42
II.4. BIORÉACTEURS À ENZYMES IMMOBILISÉES 44
II.4.1. Définition du bioréacteur enzymatique....44
II.4.2. Principe de choix et de dimensionnement....44
II.4.3. Principales configurations des bioréacteurs enzymatiques 44
II.4.4. Bioréacteur enzymatique à lit fixe 46
II.4.5. Calcul de réacteur à lit fixe à enzymes immobilisées 48
II.4.6. Traitement des colorants azoïques dans les bioréacteurs enzymatiques à peroxydase 50
Conclusion 54

Partie B : Étude expérimentale

Chapitre III. Extraction, purification et étude de la stabilité de la peroxydase

Introduction 55
III.1. RÉACTIFS ET MÉTHODES....56
III.1.1. Réactifs utilisés....56
III.1.2. Méthodes expérimentales 57
III.1.2.1. Choix de la source végétale de la peroxydase 57
III.1.2.2. Purification de la peroxydase....58
III.1.2.2.1. Purification par précipitation avec l'acétone 58
III.1.2.2.2. Purification par filtration sur gel de Sephadex G-100....58
III.1.2.3. Test de stabilité de la peroxydase 59
III.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION....60
III.2.1. Choix de la source végétale de la peroxydase 60
III.2.2. Purification de la peroxydase 62
III.2.3. Test de stabilité de la peroxydase 64
Conclusion 66

Chapitre IV. Étude de dégradation d'un colorant azoïque rouge Congo (RC) avec la peroxydase libre et immobilisée

Introduction 67
IV.1. MATÉRIELS ET RÉACTIFS....68
IV.1.1. Le colorant azoïque rouge Congo (RC)....68

IV.1.2. Support d'immobilisation : Alginate de sodium....69
IV.1.3. Principe de la microscopie électronique à balayage MEB....70
IV.2. MÉTHODES ET ANALYSES....70
IV.2.1. Estimation du rendement de décoloration....70
IV.2.2. Effet des paramètres opératoires sur la dégradation du RC par la peroxydase libre :....70
IV.2.3. Effet des effecteurs chimiques :....72
IV.2.4. Immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de calcium....72
IV.2.4.1. Préparation des billes d'alginates et optimisation des conditions d'immobilisation....72
IV.2.4.2. Analyse par MEB des billes d'alginates....74
IV.2.4.3. Effet des paramètres opératoires sur la dégradation du RC par la peroxydase immobilisée....74
IV.2.4.4. Cinétique de décoloration dans les conditions optimales....74
IV.2.4.5. Traitement des colorants par la peroxydase immobilisée en batch successifs....74
IV.3. RÉSULTATS ET DISCUSSION....75
IV.3.1. Effet des conditions opératoires sur la dégradation du RC par la peroxydase libre :....75
IV.3.1.1. Effet du pH....75
IV.3.1.2. Effet du temps de contact....76
IV.3.1.3. Effet de la température....77
IV.3.1.4. Effet de la concentration du colorant....79
IV.3.1.5. Effet de la concentration du peroxyde d'hydrogène....84
IV.3.1.6. Effet de la concentration d'enzyme....86
IV.3.1.7. Cinétique de décoloration dans les conditions optimales....87
IV.3.1.8. Effet des effecteurs chimiques :....88
IV.3.2. Optimisation des paramètres d'immobilisation de la peroxydase....89
IV.3.3. Effet des paramètres opératoires sur la cinétique de décoloration du RC par la peroxydase immobilisée....94
IV.3.3.1. Effet du pH....94
IV.3.3.2. Effet du temps de contact....94
IV.3.3.3. Effet de la température....95
IV.3.3.4. Effet de la concentration du colorant....96
IV.3.3.5. Effet de la concentration du peroxyde d'hydrogène....97
IV.3.3.6. Cinétique de décoloration dans les conditions optimales....99
IV.3.3.7. Traitement des colorants par la peroxydase immobilisée en batch successifs :....99
IV.3.3.8. Discussion sur les phénomènes de diffusion....101
Conclusion....103

Chapitre V. Décoloration du RC dans le réacteur à lit fixe à peroxydases immobilisées

Introduction....104
V.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES....105
V.1.1. Calcul de réacteur et dimensionnement approché :....105
V.1.2. Description du dispositif expérimental :....106
V.1.3. Ètude des paramètres opératoires sur le rendement de décoloration du RC dans deux bioréacteurs à lit fixe....107
V.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION....107
V.2.1. Effet du débit sur la décoloration du RC dans les deux bioréacteurs....107
V.2.2. Effet de la concentration du colorant sur la décoloration du RC dans les deux bioréacteurs....109
V.2.3. Stabilité du fonctionnement du bioréacteur à lit fixe....111
Conclusion....114

Chapitre VI. Caractérisation et identification des produits obtenus après traitement enzymatique

Introduction 115
VI.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES 115
VI.1.1. Analyse des solutions 115
VI.1.2. Analyse des produits précipités 115
VI.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION 116
VI.2.1. Analyse des solutions 116
VI.2.1.1. Analyse spectrale UV-Visible : 116
VI.2.1.2. Test de phytotoxicité : 117
VI.2.2. Caractérisation des produits précipités suite à la transformation enzymatique 118
VI.2.2.1. Analyse par FTIR: 118
VI.2.2.2. Test de toxicité 121
Conclusion 123

CONCLUSION GÉNÉRALE 124
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES
ANNEXE

Partie A : Étude bibliographique

Chapitre I. Problématique Environnementale: Pollution par les colorants azoïques

Figure I-1 : Amines hétérocycliques utilisés dans la production des colorants azoïques. 9
Figure I-2 : Étapes de préparation des colorants azoïques. 9
Figure I-3 : Préparation de Rouge Allura par diazotation et copulation. 10
Figure I-4 : Structure chimique de certains colorants azoïques appartenant à différents classes tinctoriales 13

Chapitre II. Élimination des colorants azoïques dans des bioréacteurs à peroxydase immobilisée

Figure II-1 : Structure chimique de l'hème. 29
Figure II-2 : Structure tridimensionnelle : a) de la peroxydase de raifort (HRP) b) de site actif et les acides aminés impliqués dans la catalyse. 30
Figure II-3 : Mécanisme d'oxydation des composés phénoliques en présence de peroxyde d'hydrogène par la peroxydase. 31
Figure II-4 : Mécanisme réactionnel de la peroxydase 31
Figure II-5 : Mécanisme du clivage de la fonction azo des colorants par la peroxydase. 33
Figure II-6 : Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration initiale du substrat pour une réaction de Michaelis-Menten 36
Figure II-7 : Représentation graphique en double inverse selon Lineweaver-Burck. 37
Figure II-8 : Représentation graphique de l'inhibition par excès de substrat, (a) : Variation de V_0 en fonction de $[S]_0$ sans et avec inhibition, (b) : Linéarisation selon Lineweaver-Burck. 38
Figure II-9 : Représentation schématique des mécanismes enzymatiques à deux substrats selon Cleland 39
Figure II-10 : Méthodes réversibles et irréversibles d'immobilisation des enzymes 41
Figure II-11 : Gradients de concentration pour le substrat et le produit en présence de limitations diffusionnelles. Les enzymes sont immobilisées à l'intérieur du support poreux 43
Figure II-12 : Principales configurations des bioréacteurs enzymatiques. 45
Figure II-13 : Représentation de bioréacteur enzymatique à lit fixe : (a) : du haut vers le bas, (b) du bas vers le haut 47
Figure II-14 : Elément de volume dV de réacteur à lit fixe considéré pour l'établissement du bilan sur le substrat 49

Partie B : Étude expérimentale

Chapitre III. Extraction, purification et étude de la stabilité de la peroxydase

Figure III-1 : Protocole de préparation et de dosage enzymatique des extraits bruts de chaque organe végétal. 57
Figure III-2 : Technique de purification de l'extrait brut de la peroxydase par précipitation à l'acétone. 59
Figure III-3 : Activités enzymatiques de la peroxydase pour différentes sources végétales (λ_{max}=517nm). 60
Figure III-4 : Réaction enzymatique de la peroxydase avec les substrats : phénol et peroxyde d'hydrogène 61
Figure III-5 : Profil d'élution de la peroxydase de navet sur une résine Sephadex G-100. (Une colonne de (25cmx1cm), Q=15.75 mL/h, le volume de fractions récoltées est 1ml, dilution dans 2mL 62
Figure III-6 : Variations de l'activité enzymatique pendant trois mois a) pour l'EEB, b) pour l'EEPP. 64
Figure III-7 : Stabilité des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP. 65

Chapitre IV. Étude de dégradation d'un colorant azoïque rouge Congo (RC) avec la peroxydase libre et immobilisée

Figure IV-1 : Structure moléculaire de RC pour un pH>5.5 (couleur rouge). 68
Figure IV-2 : Structure moléculaire de RC pour un pH<5.5 (couleur bleu). 69
Figure IV-3 : Structure de l'alginate, G : acide guluronique. M : acide mannuronique. 69
Figure IV-4 : Étapes d'immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de calcium. 73
Figure IV-5 : Effet du pH sur le rendement de décoloration du RC par la peroxydase libre (t=1h ; T_{amb} ; [RC]=40mg/L ; $[H_2O_2]$=0.02M ; [E]=0.6 UI/mL). 76
Figure IV-6 : Cinétique et rendement de décoloration du RC, (pH=2.0 ;T_{amb} ; [RC]=40 mg /L, $[H_2O_2]$=0,02M, [E]=0,6UI/mL). 77
Figure IV-7 : Effet de la température sur le rendement de décoloration du RC par la peroxydase libre (pH=2,0 ;t=10min ; [RC]=40mg/L ; $[H_2O_2]$=0.02 M ; [E]=0.6UI/mL). 78
Figure IV-8 : Vitesse et rendement de transformation du RC par la peroxydase libre(pH = 2,0 ;t=10min ; T_{amb} ; $[H_2O_2]$=0.02 M ; [E]=0.6UI/mL). 80
Figure IV-9 : Inhibition par excès de substrat. 80
Figure IV-10 : Linéarisation de la vitesse en fonction de la concentration du colorant pour des valeurs en RC entre 0-50 mg/L 82
Figure IV-11 : Variation des données expérimentales de la 2eme partie de la courbe de vitesse en fonction de la concentration en RC selon l'équation (IV-6) 83
Figure IV-12 : Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de RC (Comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées selon le modèle proposé 83
Figure IV-13 : Variation de la vitesse initiale et du rendement de décoloration en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène (pH = 2,0 ;t=10min ; T_{amb} ; [RC]=50mg/L ; [E]=0.6UI/mL). 84
Figure IV-14 : Représentation en double inverse de Lineweaver-Burk pour le substrat H_2O_2. 85
Figure IV-15 : Variation de la vitesse initiale et le rendement de décoloration en fonction de la concentration en enzyme (pH = 2,0 ;t=10min ; T_{amb} ; [RC]=50mg/L ; $[H_2O_2]$=0.05 M). 86
Figure IV-16 : Cinétique et rendement de décoloration du RC dans les conditions optimales (pH 2.0, T_{amb}, [RC]=50mg/L, $[H_2O_2]$=0.05M, [E]=0.45UI/mL). 87
Figure IV-17 : Observation de la couche externe des billes d'alginate de calcium par MEB a) sans enzyme, b) avec enzyme (image zoomée 40 fois). 90
Figure IV-18 : Observation de la couche externe des billes d'alginate de calcium par MEB a) sans enzyme, b) avec enzyme (image zoomée 160 fois) 90
Figure IV-19 : Billes de peroxydase immobilisée, a) avant la réaction, b) après la réaction 91
Figure IV-20 : Effet du pH sur le rendement de décoloration du RC par la peroxydase immobilisée (t=1h ;T_{amb} ;[RC]= 50mg/L ; $[H_2O_2]$=0.05M ; m_{billes} = 0.7g). 94
Figure IV-21 : Cinétique et rendement de décoloration de RC avec la peroxydase immobilisée (pH=2.0 ; T_{amb} ; [RC]=50mg/L ; $[H_2O_2]$=0.05M ; m_{billes} = 0.7g). 95
Figure IV-22 : Effet de la température sur le rendement de décoloration du RC avec la peroxydase immobilisée (pH =2.0 ; t=10min ; [RC]=50mg/L ; $[H_2O_2]$=0.05 M ; m_{billes} = 0.7g). 96
Figure IV-23 : Vitesse et rendement de transformation du RC par la peroxydase immobilisée (pH=2.0 ; t=10min ; T_{amb} ; $[H_2O_2]$=0.05 M ; m_{billes} = 0.7g). 97
Figure IV-24 : Variation de la vitesse initiale et le rendement de décoloration en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène (pH=2.0 ; t=10min ; T_{amb} ; [RC]=180 mg/L ; m_{billes} = 0.7g). 98
Figure IV-25 : Position des billes d'alginate, (a) pour $[H_2O_2]_0$>0.01M, (b) pour $[H_2O_2]_0 \leq$0.01M. 98
Figure IV-26 : Cinétique et rendement de décoloration du RC par la peroxydase immobilisée dans lesconditions optimales (pH=2.0; t=10min; T_{amb} ; [RC]=180mg/L; $[H_2O_2]$=0.01M; m_{billes} = 0.7g) 99

Figure IV-27 : Rendement de décoloration du RC après chaque utilisation (pH=2.0 ; t=10min ; T_{amb} ; [RC]=180 mg/L ;$[H_2O_2]$=0.01 M ; m_{billes}=1g).....100
Figure IV-28 : Schéma illustrant la diffusion du substrat à l'intérieur des billes.....101
Figure IV-29 : Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat RC avec l'enzyme libre et immobilisée 102

Chapitre V. Décoloration du RC dans le réacteur à lit fixe à peroxydases immobilisées

Figure V-1 : Photos des réacteurs à lit fixe à peroxydase immobilisée a) Bioréacteur de H/Ø =11.4, b)Bioréacteur de H/Ø=4 106
Figure V-2 : Variation du rendement de décoloration du RC en fonction du débit pour cinq fractions de 10mL dans le BØ5 (pH_{opt} = 2 ; T_{amb} ; [RC]=50mg/L ; $[H_2O_2]$=0.01M).....108
Figure V-3 : Variation du rendement de décoloration du RC en fonction du débit pour cinq fractions de 10mL dans le BØ3.5 (pH_{opt} = 2 ; T_{amb} ; [RC]=50mg/L ; $[H_2O_2]$=0.01M).....108
Figure V-4 : Effet du débit sur le rendement de décoloration du RC dans les deux bioréacteurs (pH_{opt}=2 ; T_{amb} ; [RC]=50mg/L ; $[H_2O_2]$=0.01M).....109
Figure V-5 : Variation du rendement de décoloration en fonction de la concentration du RC pour cinq fractions de 10 mL dans le BØ5 (pH_{opt} = 2 ; T_{amb} ;D=100mL/h ; $[H_2O_2]$=0.01M).....110
Figure V-6 : Variation du rendement de décoloration en fonction de la concentration du RC pour cinq fractions de 10 mL dans le BØ3.5 (pH_{opt} = 2 ; T_{amb} ;D=100mL/h ; $[H_2O_2]$=0.01M).....110

Chapitre VI. Caractérisation et identification des produits obtenus après traitement enzymatique

Figure VI-1 : Spectre d'absorbance du RC et son surnageant obtenu après traitement enzymatique dans l'UV-Visible 116
Figure VI-2 : État des solutions du colorant azoïque RC avant et après le traitement enzymatique (a) : RC + l'eau distillé ; (b) : RC + pH 2.0 ; (c) : RC + pH 2,0 + peroxydase 116
Figure VI-3 : Germination des graines de fèves après dix jours d'irrigation par l'eau distillé (témoin), la solution de RC, et le surnageant.....118
Figure VI-4 : Spectre IR du rouge Congo.....119
Figure VI-5 : Spectre IR du produit formé suite à la transformation enzymatique du RC 119

Partie A : Étude bibliographique

Chapitre I. Problématique Environnementale: Pollution par les colorants azoïques

Tableau I-1 : Principaux groupes chromophores et auxochromes, classés par intensité croissante 6
Tableau I-2 : Structures de base de différentes classes chimiques des colorants 7
Tableau I-3 : Classification chimique des colorants azoïques 11
Tableau I-4 : Taux de fixation sur la fibre textile et de rejets dans les effluents pour les différentes classes tinctoriales de colorants azoïques 15
Tableau I-5 : Valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents textiles.....16
Tableau I-6 : Quelques enzymes intervenant dans la dégradation de certains colorants azoïques. 24
Tableau I-7 : Comparaison de technologies physiques, chimiques, microbiologiques et enzymatiques de dépollution des effluents chargés de colorants synthétiques.....25

Chapitre II. Élimination des colorants azoïques dans des bioréacteurs à peroxydase immobilisée

Tableau II-1 : Dégradation des colorants et des effluents par la peroxydase des plantes.....34
Tableau II-2 : Application des réacteurs enzymatiques pour des réactions peroxydasiques 52

Partie B : Étude expérimentale

Chapitre III. Extraction, purification et étude de la stabilité de la peroxydase

Tableau III-1 : Propriétés physicochimiques du phénol et 4-amino-antipyrine. 56
Tableau III-2 : Valeurs d'activité enzymatique pour différentes sources végétales de la peroxydase. 61
Tableau III-3 : Caractéristiques des solutions enzymatiques avant et après la purification 63

Chapitre IV. Étude de dégradation d'un colorant azoïque rouge Congo (RC) avec la peroxydase libre et immobilisée

Tableau IV-1 : Caractéristiques générales du rouge Congo.....68
Tableau IV-2 : Variation des niveaux des paramètres pour l'étude de la dégradation du RC par la peroxydase libre 71
Tableau IV-3 : Conditions opératoires pour chaque paramètre étudié avec la peroxydase immobilisée 74
Tableau IV-4 : Constantes cinétiques déterminées pour le RC.....84
Tableau IV-5 : Constantes cinétiques déterminées pour une variation du substrat H_2O_2. 85
Tableau IV-6 : Différentes méthodes utilisées pour le traitement du RC avec leurs résultats obtenus. 88
Tableau IV-7 : Valeurs de taux d'activations et d'inhibitions de dégradation du RC pour différents composés chimiques.....88
Tableau IV-8 : Efficacité d'immobilisation et facteur d'efficacité calculés à différents concentrations en support, enzyme et $CaCl_2$.....92
Tableau IV-9 : Conditions et résultats optimales obtenus par la peroxydase libre et immobilisée. 103

Chapitre VI. Caractérisation et identification des produits obtenus après traitement enzymatique

Tableau VI-1 : Résultat de la phytotoxicité du colorant RC et son surnageant sur la germination des graines de fèves "*Vicia faba"* 117
Tableau VI-2 : Étude comparative des positions et d'intensités des bandes IR de RC et le produit formé après sa décoloration. 120
Tableau VI-3 : Valeurs de DL_{50} pour les différentes classes de toxicité 121
Tableau VI-4 : Essaie de la toxicité aiguë du produit formé suite à la transformation enzymatique du RC par la peroxydase du navet 122

Abréviations

Abréviation	Signification
	4-AminoAntiPyrine
4-AAP	Activateur
A	Alginate de sodium
AG-Na	
BØ3.5	Bioréacteur de diamètre de 3.5cm
BØ5	Bioréacteur de diamètre de 5cm
CI	Colour Index
CPO	Chloroperoxydase
DO	Densité Optique
E	Enzyme
EEB	Extrait Enzymatique Brut
EEPP	Extrait Enzymatique Partiellement Purifié
HRP	Horseradish peroxidase
I	Inhibiteur
LiP	Lignine peroxydase
MEB	Microscope électronique à balayage
MnP	Manganèse peroxydase
P	Produit
RC	Rouge Congo
S	Substrat
UV	Ultraviolet

Indices

Indice	Désignation
Aff	Affinité
Col	Colorant
Eim	Enzyme immobilisée
EL	Enzyme libre
F	filtrat
Fi	finale
In	initiale
L	libre
Max	Maximal
opt	Optimal

Mis en forme : Espace Après : 0 pt, Interligne : simple

Mis en forme : Espace Après : 0 pt, Interligne : simple

Mis en forme : Espace Après : 0 pt, Interligne : simple

Mis en forme : Espace Après : 0 pt, Interligne : simple

Mis en forme : Espace Après : 0 pt, Interligne : simple

Mis en forme : Espace Après : 0 pt, Interligne : simple

Notation et symbole

Symbole	**Unité**	**Définition**
K_1, K_2, K_{-1}		Constantes de vitesses
K_{aff}	mol/L ou mg/L	Constante d'affinité
K_m	mol/L ou mg/L	Constante de Michaelis–Menten
K_s	mol/L ou mg/L	Constante de dissociation du complexe E-S
K_{si}	mol/L ou mg/L	Constante d'inhibition par le substrat
k_{cat}	µmol/s/unité enzymatique	Constante catalytique
R^2		Coefficient de corrélation
λ	nm	Longueur d'onde
t	min	temps
T	°C	Température
A	UI/mL ou mg/(L.min)	Activité enzymatique
v_0	UI/mL ou mg/(L.min)	Vitesse initiale de la réaction
τ_a	%	Taux d'activation
τ_i	%	Taux d'inhibition
m	g	Masse
p	g	Poids
V	mL	Volume
EI	%	Efficacité d'immobilisation
Φ		Module de Thiele
η		Facteur d'efficacité
ε		porosité
Ø	cm	Diamètre du bioréacteur
H	cm	Hauteur du bioréacteur
DL_{50}	mg/kg	Dose létale provoquant 50% de mortalité

Introduction générale

Introduction générale

Nous vivons dans un monde où tout est coloré, nos vêtements, nos aliments, nos produits cosmétiques, pharmaceutiques, etc. Le secteur des colorants constitue une véritable industrie qui est impliquée dans un grand éventail de domaines : industrie textile, imprimerie, industrie pharmaceutique, cosmétique et agro-alimentaire. Ces colorants sont pour la plupart synthétiques et représentent aujourd'hui un large groupe de composés chimiques. La production mondiale de ces colorants de synthèse est évaluée à 800 000 $t.an^{-1}$. Une partie de ces colorants, approximativement 140000 $t.an^{-1}$, sont rejetées lors des étapes de fabrication et coloration des tissus. Parmi les nombreuses familles de colorants synthétiques, les colorants azoïques sont les plus largement utilisés (60 à 70 %) [1]. Ces colorants constituent un groupe de composés caractérisés par une ou plusieurs liaisons azoïques (R_1-N=N-R_2) en association avec un ou plusieurs groupements aromatiques, ce qui les rend très stables et relativement peu biodégradables [2]. Beaucoup d'études ont montré, d'autre part, des effets toxiques et/ou carcinogènes générés par les colorants azoïques, ce qui contraint à traiter les effluents contenant ces colorants avant de les rejeter dans le milieu naturel [3].

Comme les normes internationales de protection de l'environnement deviennent de plus en plus strictes, la décoloration des effluents colorés a reçu ces dernières années une attention croissante. Les colorants peuvent être éliminés avec une efficacité plus ou moins importante par des procédés physiques de traitement tel que l'adsorption sur charbon actif, la filtration, la floculation par des agents chimiques etc. Ces procédés sont cependant non-destructifs. Ils se limitent, dans la plupart des cas, à un transfert des polluants au lieu d'un traitement radical [4]. Pour sa part, le traitement biologique, dans des bioréacteurs ou par les procédés à boues activées, n'a pas prouvé son efficacité et sa concurrence avec les procédés physico-chimiques. La dégradation biologique est limitée par l'adaptation préalable des microorganismes ainsi que l'inhibition par excès de substrat ou par le produit de dégradation. La génération de sous-produits de biodégradation pouvant à leur tour être toxiques et la durée relativement longue du traitement sont d'autres causes qui pourraient limiter les avantages connus du procédé biologique [5]. La capacité de dégradation de ces microorganismes est due à la présence de certaines enzymes constitutives appartenant à la famille des oxydoréductases telles que la peroxydase. Ce type d'enzymes peuvent être excrétées par certaines espèces de microorganismes et peuvent aussi facilement être extraites d'organismes supérieurs tel que les plantes ou les graines végétales [6].

L'utilisation directe de ces enzymes pour la transformation des colorants azoïques en polymères peu solubles dans l'eau, facilite l'élimination de ces derniers par filtration ou par précipitation. Les procédés enzymatiques courants sont intéressants du point de vue : simplicité de mécanisme d'action, régénérabilité du biocatalyseur, rapidité de transformation, réduction de volume réactionnel, flexibilité

de fonctionnement et facilité de contrôle des conditions opératoires. La détection de la nature des produits de la réaction ainsi que leur séparation sont en général faciles à réaliser [7]. La peroxydase a été l'enzyme la plus étudiée, vu son abondance dans le monde bactérien et végétal. En présence de peroxyde d'hydrogène comme co-substrat, le colorant sera polymérisé et précipité en quelques minutes sous des conditions modérés de pH et de température. Cette enzyme présente aussi certains avantages tels que: la non spécificité pour une large gamme de substrats aromatiques, sa stabilité dans les conditions physico-chimiques diverses (température et le pH), simplicité de mécanisme d'action. La simplicité de la méthode de séparation et de purification de la peroxydase rend son coût peu onéreux et son utilisation attractive pour la décoloration des effluents à l'échelle industrielle [8].

Les enzymes ont paru dès le début comme un mode privilégié d'utilisation de la biocatalyse. Ces biocatalyseurs peuvent présenter cependant quelques inconvénients parmi lesquels leur manque de stabilité et leur coût qui ont pu paraître rédhibitoires pour certaines applications. A ces inconvénients ont répondu les techniques d'immobilisation contribuant à la stabilisation des enzymes dans leurs conditions d'utilisation, à leur récupération éventuelle pour réutilisation et à la possibilité de développer des réacteurs fonctionnant en continu. Ce qui a ouvert la voie à l'exploitation industrielle [9]. D'autres avantages majeurs de ces techniques sont d'augmenter, de façon souvent considérable, la productivité des bioréacteurs et la pureté des produits. Plusieurs procédés en continu avec des enzymes immobilisées peuvent être réalisés dans différents types de bioréacteurs. Parmi ceux-ci, les réacteurs à lit fixe ont plusieurs avantages par rapport aux autres et représentent un intérêt considérable dans le traitement des eaux usées [10].

Dans ce contexte, la conception et la réalisation d'un bioréacteur à peroxydase immobilisée pour le traitement d'une solution contaminée par un colorant azoïque a fait l'objectif de la présente étude. Le choix du type (configuration) du bioréacteur, son dimensionnement et son mode de conduite reposent sur le mécanisme et sur la cinétique de la réaction enzymatique (biosynthèse ou biodégradation). Par ailleurs, ce choix dépend aussi des spécificités du domaine d'application du bioprocédé. Deux objectifs principaux sont ciblés dans le développement de nouveaux systèmes, un objectif de qualité et un objectif de coût, avec une préoccupation générale de souplesse de procédé et de durabilité. Le réacteur tubulaire à lit fixe étant la configuration la plus répandue dans le traitement des effluents, vu la facilité de sa conception et de sa mise en œuvre nécessitant peu de contrôle et sa stabilité de fonctionnement [11].

L'objectif de notre travail a donc été de concevoir et dimensionner un réacteur de laboratoire permettant la dégradation continue d'un colorant azoïque appelé rouge Congo (RC) en utilisant

l'enzyme peroxydase extraite et purifiée à partir du navet blanc "*Brassica rapa*" puis immobilisée dans un support naturel alginate de calcium. Ce travail est structuré en six chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique sur les colorants et en particulier les colorants azoïques : leur définition, leur classification, leurs propriétés chimiques, leurs toxicités et leurs impacts environnementaux. Puis on expose à travers une synthèse bibliographique, une présentation de la problématique liée à la présence des colorants dans les rejets industriels et les risques potentiels associés à ces produits, ainsi que les principales méthodes de traitement.
- Nous présentons, dans le deuxième chapitre, une synthèse bibliographique des travaux antérieurs sur la biodégradation des différents colorants azoïques utilisés surtout dans l'industrie textile par la peroxydase. Au cours de cette présentation, nous effectuerons une synthèse générale sur la possibilité du traitement de ces colorants dans différents types de bioréacteurs par la peroxydase. Puis nous détaillerons plus particulièrement les résultats de la littérature concernant l'intérêt d'utilisation des bioréacteurs à lit fixe dans la décoloration.
- La partie expérimentale est initiée dans le troisième chapitre par la séparation, la purification et la caractérisation de l'enzyme peroxydase à partir du navet blanc "*Brassica rapa*".
- L'étude de la dégradation d'un colorant azoïque modèle, le rouge Congo (RC) par la peroxydase de navet est entamée dans le quatrième chapitre. Une étude approfondie sur la cinétique enzymatique réelle (enzyme libre) et apparente (enzyme immobilisée) est menée afin de déterminer les paramètres cinétiques et diffusionnels de la réaction d'oxydation du colorant azoïque. Par la suite les conditions opératoires optimales sont déterminées. Ces données et ces modèles cinétiques seront utilisés pour la conception d'un bioréacteur enzymatique à lit fixe, garni de peroxydase immobilisée dans l'alginate de calcium, dont le fonctionnement est basé sur l'hypothèse de l'écoulement piston.
- Dans le cinquième chapitre, l'effet de différents paramètres expérimentaux (rapport hauteur/diamètre, débit d'écoulement, concentration de substrat dans l'alimentation et la stabilité de la conduite du bioréacteur) sur le rendement d'élimination du colorant sera étudié dans le but de déterminer les conditions de fonctionnement optimales permettant d'atteindre la meilleure efficacité et la durabilité optimale.
- Quant au sixième et dernier chapitre, il sera consacré à la caractérisation et l'identification des produits obtenus suite à la transformation enzymatique par différents méthodes.

Enfin nous avons terminé le manuscrit par une conclusion générale synthétisant les principaux résultats de cette étude, ainsi que les perspectives ouvertes par ce travail.

Partie A :
Étude bibliographique

Chapitre I. Problématique Environnementale : Pollution par les colorants azoïques

Introduction

Mieux produire et moins polluer sont les défis auxquels sont confrontés les industriels de tout secteur. Les contraintes sous forme législatives et normatives sont de plus en plus drastiques. Toute activité industrielle engendre des rejets polluants indésirables et le traitement des effluents est progressivement devenu une priorité pour de nombreuses industries. L'industrie textile est l'une des cibles favorites des mouvements écologistes qui lui rapprochent d'être particulièrement dangereuse pour l'environnement aquatique par ses effluents chargés en colorants. Les colorants azoïques constituent l'une des plus grandes classes des colorants textiles, dont les effets de leur toxicité, sont généralement cancérigènes pour l'environnement et par conséquent sur les êtres vivants [12].

Il existe un certain nombre de techniques de dépollution des eaux polluées colorés produites par les filières industrielles. Parmi celles-ci, figurent l'oxydation chimique, l'adsorption sur charbon actif, la séparation par membrane, les technologies photocatalytiques ainsi que le traitement biologique par boues activées. Cependant, ces procédés ont un coût de plus en plus élevé [13]. Il y a donc un intérêt croissant à développer des méthodes efficaces et peu onéreuses de traitement et de dépollution. De nombreux travaux scientifiques transdisciplinaires ont été conduits depuis une trentaine d'années et publiés dans la littérature.

Ce constat nous a amenés à orienter ce chapitre sur les colorants et plus particulièrement sur les colorants azoïques en précisant leur structure, leur classification et leurs propriétés chimiques. L'impact des rejets industriels chargés par les colorants sur l'environnement sera alors évoqué puis les différentes méthodes physico-chimiques et biologiques seront abordées. Nous prendrons soin d'évoquer à la fois leurs avantages et leurs inconvénients vis-à-vis du traitement des colorants. Enfin, quelques précisions seront apportées quant aux méthodes enzymatiques actuellement étudiées pour répondre aux réglementations internationales dans le but de traiter ces effluents.

I.1. LES COLORANTS

I.1.1. Définition des colorants

Les matières colorantes se caractérisent par leur capacité à absorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible (de 400 à 700 nm). Tous les composés répondant à cette définition se différencient par leur structure chimique, organique ou inorganique, ou par leur origine, naturelle ou synthétique. Cependant, la distinction faite entre les colorants et les pigments est bien plus importante puisqu'elle tient compte de l'interaction entre la matière colorante et le substrat. Les pigments ont la particularité d'être insolubles dans le milieu où ils sont appliqués, ce qui nécessite de faire appel à des produits auxiliaires, comme certains polymères dans la peinture, pour assurer la cohésion avec le support [14].

Auparavant, les colorants sont d'origine naturelle, animale (murex, kermès et cochenille) ou végétale (garance, gaude, indigo, lichens, bois de campêche) obtenues par des procédés simples comme le chauffage ou le broyage [15]. La mauvéine fut le premier colorant mauve synthétisé par hasard à partir de l'aniline par William Perkin (1838-1907) à Londres en 1856. De nombreux autres colorants synthétiques seront découverts dans les années suivantes. Des industries prospères et dynamiques seront spécialisées dans les colorants synthétiques vont alors naître. Il existe seulement une dizaine de colorants naturels, alors que l'on compte des milliers de colorants synthétiques. Si l'on compare les colorants naturels et synthétiques, les premiers sont moins nombreux, présentent des difficultés de manipulation et des problèmes de stabilité, ce qui conduit à ce qu'aujourd'hui les colorants de synthèse soient majoritairement utilisés [16]. Les colorants synthétiques sont de plus en plus utilisés en industrie de coloration et de textile, grâce à leur synthèse assez facile, de leurs productions rapides et de la variété de leurs couleurs comparées aux colorants naturels [17].

I.1.2. Structure des colorants

En 1876, C'est le chimiste allemand Witt qui a introduit la théorie du pouvoir colorant. Witt en a déduit que toute molécule colorée renferme des groupes d'atomes insaturés, c'est à dire qu'ils possèdent une ou plusieurs doubles liaisons. Ces groupes d'atomes responsables de la couleur des colorants sont appelés groupes *chromophores*. Les molécules ne possédant que des groupes chromophores sont appelés des *chromogènes,* qu'ils sont de structure aromatique. En plus de contenir ce système chromophore, les matières colorantes azoïques peuvent également posséder des groupes fonctionnels connus sous le nom d'*auxochromes* (c-à-d réhausseurs de couleur), tels que l'acide carboxylique, l'acide sulfonique, les groupes amines et les groupes hydroxyles (Tableau I-1) [18].

Les auxochromes ne produisent pas de couleur, mais ils peuvent modifier l'intensité et la longueur d'onde de la lumière absorbée et peuvent également être utilisés pour influencer la solubilité. Par conséquent, la présence de ces substituants influe sur les propriétés physiques et chimiques et sur les caractéristiques de performance de la matière colorante. La position du chromophore et auxochrome a également un effet. En général, la longueur d'onde d'absorption de la position méta (M) est plus courte que la longueur d'onde de la position para (P) et ortho (O), cela est due aux phénomènes de résonances [19].

Tableau I-1: Principaux groupes chromophores et auxochromes, classés par intensité croissante [20]

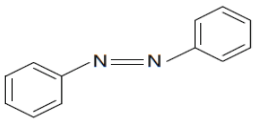
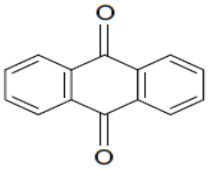
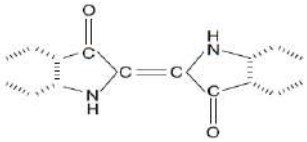
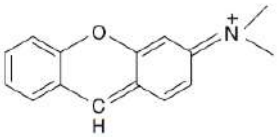
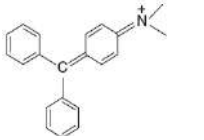
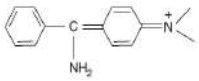
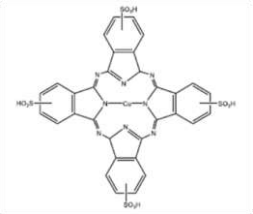
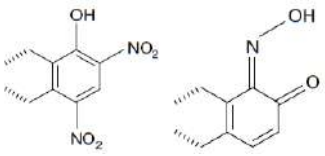
Groupes chromophores	**Groupes auxochromes**
Azo (-N=N-)	Amino ($-NH_2$)
Nitroso (-N=O ou -N-OH)	Méthylamino ($-NHCH_3$)
Carbonyl (=C=O)	Diméthylamino ($-N(CH_3)_2$)
Vinyl (-C=C-)	Hydroxyl (-OH)
Nitro ($-NO_2$ ou NO-OH)	Alkoxyl (-OR)
Sulfure (>C=S)	Groupes donneurs d'électrons

I.1.3. Classification des colorants

Depuis la découverte de la « mauvéine » par Perkin en 1856 et de la « fuchsine » par Verguin en 1858, de très nombreux colorants ont été élaborés. On en dénombre aujourd'hui plus de 10000 en production industrielle et il a été nécessaire d'avoir un système de classification. Celui-ci constitue l'index des couleurs (en anglais Colour Index noté C.I.) qui répertorie la majorité des colorants mis sur le marché [17]. Dans ce système, chaque colorant est classé selon son nom générique de « Colour Index » (C.I.) qui décrit ses caractéristiques essentielles telles que : formule chimique, couleur et nuance, résistance à la lumière, aux solvants, à la chaleur, à différents agents chimiques ainsi qu'une description des principaux domaines d'utilisations. Chaque colorant dans le Colour Index, porte un numéro de référence constitué par : le code C.I., le nom générique de la classe d'application, la couleur (écrite complètement ou désignée par les initiales), et le numéro d'ordre chronologique d'inscription au Colour Index (exemple : C.I. Disperse Blue 106) [21].

Une classification rationnelle des matières colorantes organiques présente de grandes difficultés. Certains auteurs regroupent ces colorants d'après leur constitution chimique, en tenant compte de la nature des chromophores qui les composent d'autres les regroupent d'après les diversités des technologies d'application. Au sein d'une même famille chimique, on trouve regroupés des colorants ayant différents champs d'application et, en parallèle, pour un domaine d'application, différentes familles chimiques peuvent être utilisées [21].

Tableau I-2 : Structures de base de différentes classes chimiques des colorants [22,23].

Colorant	Caractéristiques	Chromophore
Azoïque	Présence d'un groupement azoïque (-N=N-). Cette classe présente la catégorie la plus répandue sur le plan d'application.	
Anthraquinonique	Les plus importants après les colorants azoïques où le chromophore est un noyau quinonique sur lequel peuvent s'attacher des groupes hydroxyles ou amino.	
Indigoïde	Tirent leur appellation de l'indigo dont ils dérivent. Leur principe actif est l'indole (composé bicyclique). Ils ont trouvés dans certains escargots de mer et la plante indigo	
Xanthène	Sont dotés d'une intense fluorescence et peu utilisés en tant que teinture. Leur usage est bien établi comme traceurs d'écoulement pour des rivières souterraines, des flux de rejets, etc.	
Triphénylméthane Diphénylméthane,	Constituent la plus ancienne classe de colorants synthétiques. Ils permettent de couvrir la totalité de la gamme de nuances. Leur coloration intense provient du large système conjugué de l'ion cationique.	 
Phtalocyanines	Ont une structure complexe possédant un atome métallique central et quatre groupements phtalimides. Ils ont retrouvés dans les couleurs bleu turquoise et vert vif.	
Nitrés et nitrosés	Les nitrés sont synthétisés par action de l'acide nitrique HNO_3sur les phénols et les nitrosés par l'action de l'acide nitreux HNO_2	

Dans la classification chimique, les colorants sont répartis en différentes familles selon la nature chimique des chromophores présents, pour cette raison cette classification chimique présente un intérêt pour le fabricant de matières colorantes [24]. Le tableau I-2 représente les principales classes chimiques des colorants. Les colorants azoïques faisant l'objet de cette étude seront traités plus en détail dans la section I.2.

I.2. LES COLORANTS AZOÏQUES

I.2.1. Définition et utilisation

Les colorants azoïques sont des composés organiques caractérisés par le groupe fonctionnel azo (N=N) unissant deux radicaux alkyle ou aryle identiques ou non (azoïques symétriques et dissymétriques). Les matières colorantes azoïques produisent de la couleur, car elles reflètent, transmettent ou diffusent de façon sélective la lumière dans la partie visible du spectre (c.-à-d., de 400 à 750 nm), contiennent un ou plusieurs groupes chromophores (c.-à-d., liaisons azoïques), ont un système conjugué d'électrons et affichent une certaine stabilité en raison de la résonance des électrons [25].

L'aspect esthétique des produits affecte, dans une certaine mesure, leur succès commercial. L'industrie des colorants constitue un marché économique considérable car de nombreux produits industriels peuvent être colorés, principalement dans : l'industrie textile, agroalimentaire pharmaceutique, cosmétiques, papeterie, l'industrie du bâtiment et dans divers industries. Par rapport aux autres colorants, les colorants azoïques représente la majorité des colorants commerciaux grâce aux propriétés suivantes [24] :

- ✓ La fonction azo permet de créer de très nombreuses molécules avec des processus assez simple et par conséquent la diversité des coloris
- ✓ Leur facilité d'application sur les fibres et leur prix modique
- ✓ Leur coefficients d'extinction molaire élevés ce qui donnent des couleurs vives et de haute intensité

I.2.2. Préparation des colorants azoïques

La majorité des composés azoïques sont obtenus à partir des deux réactions successives:

- ***Réaction de diazotation*** : Elle a pour but d'obtenir des sels de diazoniumin stables à partir des amines aromatiques primaires. Pratiquement chaque amine aromatique primaire est un élément potentiel dans la constitution des colorants azoïques. Quelques amines hétérocycliques techniquement importantes utilisées dans leur préparation sont présentés dans la figure I-1.

Les colorants à composants hétérocycliques ont reçu beaucoup d'attention en raison de leur pouvoir tinctorial élevé et une excellente intensité [26]. Il existe de nombreuses méthodes décrites pour la synthèse des colorants azoïques. Une technique importante consiste à traiter une arylamine primaire avec du nitrite de sodium en présence d'un acide minéral à basse température de 0 à 5°C pour former un sel de diazonium, comme indiqué dans la figure I-2 [27].

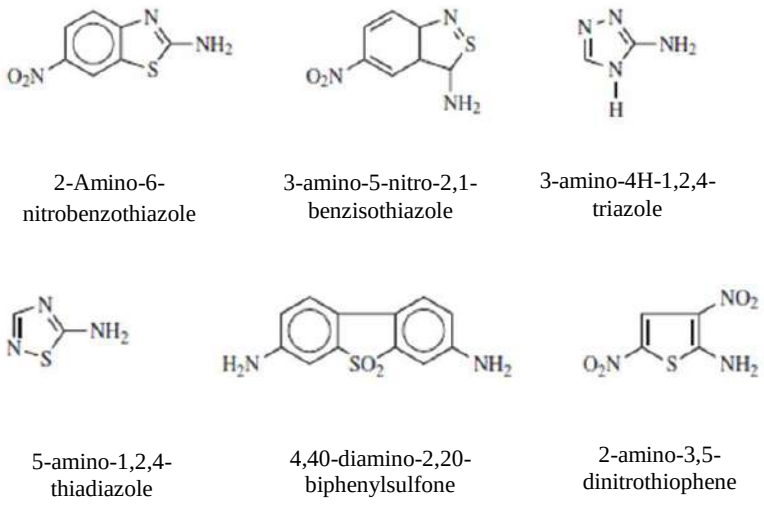
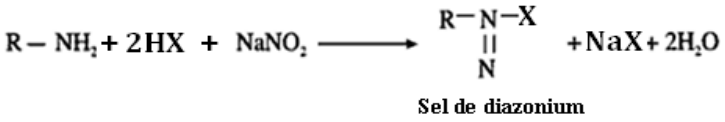


Figure I-1: Amines hétérocycliques utilisés dans la production des colorants azoïques [26].

Diazotation :



Copulation :

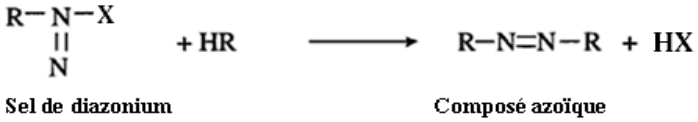


Figure I-2: Étapes de préparation des colorants azoïques [24,28].

- ***Réaction de copulation*** du sel de diazonium avec un intermédiaire qui peut être un phénol ou une amine aromatique. Il constitue le colorant azoïque stable [24]. A titre illustratif, les étapes de préparation selon les étapes de diazotation et de copulation du Rouge Allura sont récapitulées dans la figure I-3 :

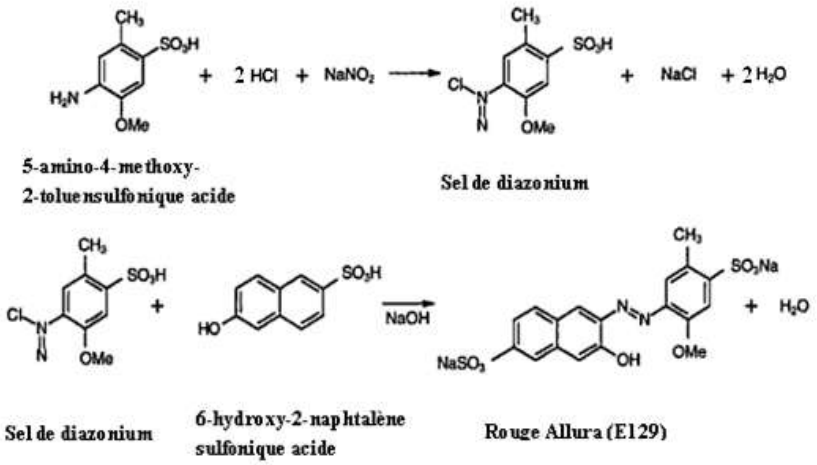


Figure I-3 : Préparation de Rouge Allura par diazotation et copulation [24].

I.2.3. Classification des colorants azoïques :

I.2.3.1. Classification chimique

Dans sa nomographie sur les azoïques, Zollinger [24] cite plus de 2 400 références, non compris les brevets. Plus de la moitié des 2 500 colorants commerciaux actuels sont des azoïques. Leur importance économique, en volume et en valeur, représente aussi la moitié du marché mondial des colorants. Chaque matière colorante a également un nombre de constitution du C.I. à cinq chiffres qui détermine sa structure chimique particulière. Les matières colorantes azoïques ont des nombres de constitution du C.I. allant de 11 000 à 36 999, selon le nombre de liaisons azoïques qu'elles contiennent. Par exemple, une matière colorante monoazoïque a une liaison azoïque, une matière colorante diazoïque a deux liaisons azoïques, une matière colorante triazoïque a trois liaisons azoïques, etc [29]. Le tableau I-3 donne la classification chimique des colorants azoïques accompagné avec leur numéro dans le Colour Index.

Commentaire [c1]: Ajoutez reference

Tableau I-3 : Classification chimique des colorants azoïques [29].

Classe chimique	*Numéro dans Colour Index*
Monoazo	11,000–19,999
di-azo	20,000–29,999
tri-azo	30,000–34,999
polyazo	35,000–36,999

I.2.3.2. Classification tinctoriale

La classification tinctoriale des colorants repose sur la nature du groupe auxochrome, qui détermine le type de la liaison colorant-substrat (figure I-4). Selon la classification tinctoriale générale des colorants et leur application industrielle, les colorants azoïques sont aussi classés en [30]:

- *Colorants azoïques à mordant* : un grand nombre de colorants naturels non ioniques ne pouvait se fixer sur les fibres textiles qu'après traitement préalable de ces dernières. Ce traitement dénommé mordançage, consistait à précipiter dans les fibres textiles des oxydes de certains métaux (Al, Fe, Co, Cr) avec lesquels les colorants pouvaient ensuite former une laque insoluble solidement fixée à la matière textile. Les colorants à mordant sont principalement utilisés pour colorer la laine, le cuir, les fourrures et l'aluminium anodisé.

- *Colorants azoïques métallifères* : pour faciliter le travail du teinturier en lui évitant l'opération de mordançage, l'idée est venu d'incorporer le métal au colorant lui-même en formant le complexe métallifère au préalable au lieu de le précipiter dans la fibre de façon subséquente. Ils permettent de teindre la laine, la soie et le polyamide en nuances très solides. ces colorants contiennent un atome métallique (Cr, Ni, Co) qui peut être associé.

- *Colorants azoïques acides* : Très solubles dans l'eau grâce à leurs groupes sulfonâtes ou carboxylates qui ont généralement un poids moléculaire plus faible que les colorants directs. Ils sont ainsi dénommés parce qu'ils permettent de teindre les fibres animales (laine et soie) et quelques fibres acryliques modifiées (nylon, polyamide) en bain légèrement acide. L'affinité colorant - fibre est le résultat de liaisons ioniques entre la partie acide sulfonique du colorant et les groupes amino des fibres textiles.

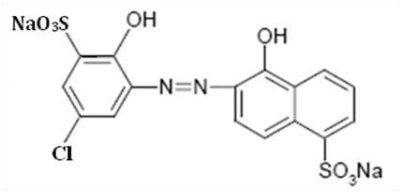
- *Colorants azoïques basiques* : sont des colorants cationiques hydrosolubles et reconnus pour leurs nuances brillantes, qui sont en général utilisés sur certaines fibres textiles qui sont des polymères à charge négative comme les fibres d'acryliques car sur ce type de fibres, on obtient des coloris très solide sur lesquelles ils permettent des nuances très vives et résistantes [31].

- *Colorants azoïques directs* : sont des colorants anioniques solubles dans l'eau (présence des groupements sulfonâtes). Ils se distinguent des colorants acides par leur affinité pour les fibres cellulosiques sans application de mordant, affinité en partie due à leur forme linéaire et à la structure coplanaire des noyaux aromatiques entrant dans leur constitution. Les colorants directs sont principalement utilisés pour colorer en continu le papier, les fibres textiles cellulosiques (le coton et la rayonne) et le cuir. Le premier colorant de cette catégorie fut le **Rouge Congo (RC)** qui s'avéra capable de teindre directement le coton.

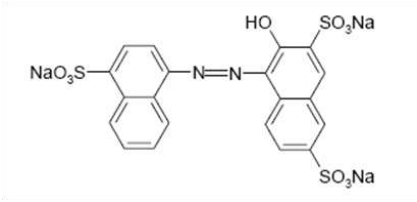
- *Colorants azoïques réactifs* : sont similaires aux colorants directs sur le plan chimique, sauf qu'ils contiennent en plus de leur groupement chromophore azoïque des groupes réactifs de type triazinique ou vinylsulfone, assurant la formation d'une liaison covalente forte aux groupes hydroxyles, sulfhydryles et amines des fibres. Ils entrent de plus en plus fréquemment dans la teinture du coton et éventuellement dans celle de la laine et des polyamides.

- *Colorants azoïques dispersés* : appelés aussi plasto-solubles, sont très peu solubles dans l'eau et sont appliqués sous forme d'une fine poudre dispersée dans le bain de teinture. Ils sont en mesure, lors d'une teinture à haute température, de diffuser dans les fibres synthétiques puis de s'y fixer. Ils sont généralement appliqués à des fibres synthétiques à partir de dispersions aqueuses dans des conditions légèrement acides. Les molécules de colorant adsorbent à la surface de la fibre, puis ils migrent vers l'intérieur lorsque la température augmente. Les colorants dispersés sont principalement utilisés pour colorer le polyester, les mélanges de polyester, l'acétate de cellulose et le nylon.

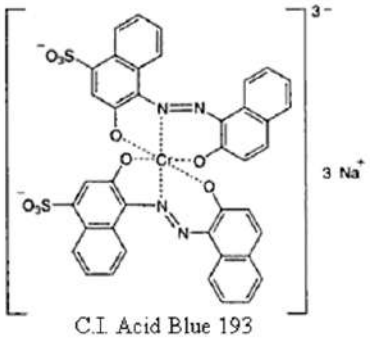
- *Colorants azoïques insolubles de type solvants :* sont des colorants non ioniques et insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants qui ont tendance à avoir un poids moléculaire plus élevé que les colorants dispersés. Ils sont principalement utilisés pour colorer les huiles et les graisses, les vernis, les cires, les encres, les plastiques, et les produits d'huile minérale.



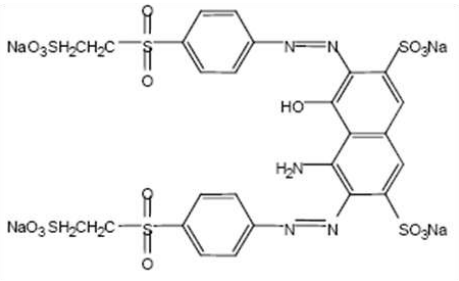
C.I. Mordant Blue 9



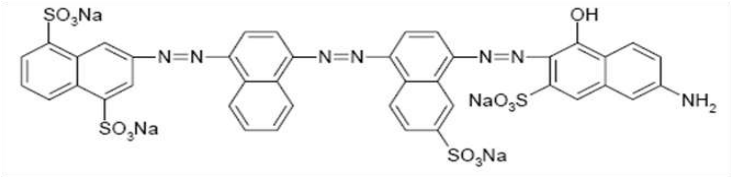
C.I. Acid Red 27



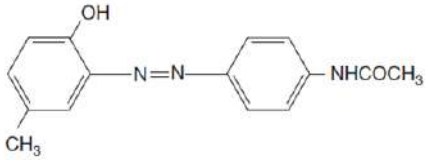
C.I. Acid Blue 193



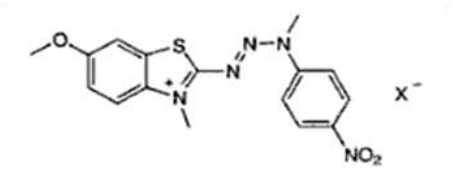
C.I. Réactive Black 5



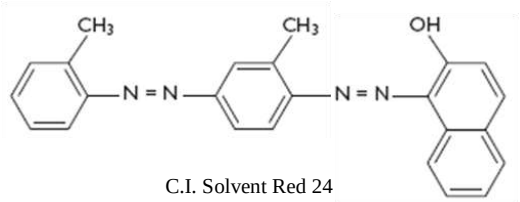
C.I. Direct Blue 71



C.I. Disperse Yellow 3



C.I. Basic Yellow 19



C.I. Solvent Red 24

Figure I-4: Structure chimique de certains colorants azoïques appartenant à différents classes tinctoriales [24,32].

I.3. IMPACTS SUR L'ENVIRONNEMENT DE LA POLLUTION ENGENDRÉE PAR LES COLORANTS AZOÏQUES

I.3.1. Evaluation de la pollution

Par pollution de l'eau, on entend un état qualitatif d'impuretés ou de manque de propreté des eaux hydrologiques d'une certaine région, comme un bassin versant. La plupart des effluents pollués sont des mélanges très complexes dont la composition varie suivant leur provenance industrielle, agricole ou urbaine. L'évaluation de la pollution est donc basée sur des classifications selon les propriétés globales de l'effluent. La pollution se définit comme l'introduction dans un milieu naturel de substances étrangères conduisant à son altération. Les effets néfastes peuvent avoir lieu à tous les niveaux (sanitaire, écologique et économique). Ainsi, par exemple, les polluants sous forme particulaire provoquent entre autre une augmentation de la turbidité de l'eau et un envasement [33].

Les rejets industriels sont nombreux et d'une composition très variée qui exigent souvent une analyse approfondie en laboratoire. Un traitement spécialisé peut s'imposer pour les rendre inoffensifs avant leur rejet. Les principales sources de rejets industriels sont : les papeteries, textiles, brasseries, tanneries, alimentaire, industries chimiques et pétrolières, etc [33].

Les industries textiles et plus particulièrement les phases de teinture et d'ennoblissement, utilisent principalement des produits chimiques, nuisibles pour la santé, comme certains colorants azoïques cancérogènes. Une pollution systématique pourra alors être engendrée au niveau des eaux de surface et des nappes phréatiques en raison de leur stabilité et de leur faible biodégradabilité [5,34].On estime qu'il ya plus de 10 000 colorants commerciales disponibles dans le marché avec une production de plus de 7×10^5 tonnes par an [35]. Cependant, les azoïques sont les plus utilisés dans l'industrie textile avec une proportion de 60 à 70 % [36], en raison de leur pouvoir tinctorial important sur plusieurs fibres d'une part et leur stabilité thermodynamique d'autre part, environ 10-15% des colorants de synthèse sont rejetés dans les effluents, provoquant ainsi des problèmes écologiques [37].

Selon un rapport publié en 2000 par la fédération des industries de textile, la consommation en pigment et colorants de ce secteur en Algérie dépasse les 4012 tonnes annuellement [38]. L'hétérogénéité des effluents issus de ce secteur ne facilite pas leur traitement. La coloration de ces eaux usées est de plus en plus perçue comme une nuisance importante. Au cours des différentes étapes du procédé de teinture, des quantités plus ou moins importantes de colorants sont perdues par manque d'affinité avec les surfaces à teindre ou à colorer (tableau I-4) et se retrouvent dans les rejets. L'efficacité de fixation change avec la classe du colorant azoïque utilisée, qui est autour de 98% pour les colorants basiques alors qu'elle ne dépasse pas 50% pour les colorants réactifs [39].

Tableau I-4 : Taux de fixation sur la fibre textile et de rejets dans les effluents pour les différentes classes tinctoriales de colorants azoïques [40].

Classe de colorant	Fibre utilisées	Fixation (%)	Rejet (%)
Acide	Laine, nylon	80—93	7—20
Basique	Acrylique	97—98	2—3
De cuve	Cellulose	80—95	5—20
Directe	Cellulose	70—95	5—30
Dispersé	synthétique	80—92	8—20
Réactif	Cellulose	50—80	20—50
Dispersé	Cellulose	60—70	30—40

I.3.2. Législation et impact sur l'environnement

Les principales questions environnementales soulevées par les activités de l'industrie textile concernent essentiellement les rejets dans l'eau qui constitue le principal vecteur pour éliminer les impuretés. Les colorants azoïques représentent le rang de polluants majeurs des rejets liquides des teintureries textile [41]. Comme il est indiqué dans la section précédente (section I.2), les substances azoïques et à base de benzidine ont tout un éventail de propriétés physiques et chimiques. La grande solubilité dans différents milieux, la propriété hydrophobe, la couleur intense, les coefficients de partage et la charge électrique sont des paramètres importants à prendre en compte lorsqu'on détermine le devenir de ces substances dans l'environnement [42,43]. En effet, ils sont considérés comme des précurseurs de formation de plusieurs intermédiaires et produits de dégradations toxiques et cancérigènes. En outre, la majorité des colorants azoïques ne sont pas biodégradables et peuvent constituer des facteurs de risque pour la santé et des nuisances pour l'environnement non seulement à court terme mais à des périodes allant jusqu'à des milliers d'années [44,45].

L'Algérie est dotée d'une réglementation **06-141** sur les rejets d'effluents textiles dans le milieu hydrique. Le tableau I.5. indique les limites réglementaires de ces rejets [46]. Le rejet de ces eaux résiduaires chargées en colorants azoïques dans l'écosystème constitue une source dramatique de pollution, d'eutrophisation et de perturbation non esthétique dans la vie aquatique et par conséquent présente un danger potentiel de bioaccumulation qui peut affecter l'homme par transport à travers la chaîne alimentaire.

Tableau I-5: Valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents textiles [46].

PARAMÈTRES	UNITÉ	VALEURS LIMITES	TOLÉRANCE AUX VALEURS LIMITES ANCIENNES INSTALLATIONS
Température	°C	30	35
pH	-	6.5-8.5	6-9
DBO_5	mg/L	150	200
DCO	-	250	300
Matière décantable	-	0.4	0.5
Matière non dissoute	-	30	40
Oxydabilité	-	100	120
Permanganate	-	20	25

I.3.3. Dangers à court terme :

a. **Eutrophisation:** Différents ions peuvent être évacués dans le milieu naturel tel que le phosphate, utilisé comme détergent lors du processus d'ennoblissement ou le nitrate libéré sous l'action des microorganismes sur les colorants. Ces ions minéraux introduits en quantité trop importante peuvent devenir toxiques pour la vie piscicole et altérer la production d'eau potable. Leur consommation par les plantes aquatiques accélère leur prolifération anarchique et conduite à l'appauvrissement en oxygène par inhibition de la photosynthèse dans les strates les plus profondes des cours d'eau et des eaux stagnantes [47].
b. **Sous oxygénation :** lorsque des charges importantes des colorants azoïques sont apportées au milieu via des rejets ponctuels, les processus naturels de régulation ne peuvent plus compenser la consommation bactérienne d'oxygène. Il a été estimé que la dégradation de 7 à 8 mg de matière organique par des microorganismes suffit pour consommer l'oxygène contenu dans un litre d'eau [2].
c. **Couleur, turbidité, odeur :** L'accumulation des matières organiques dans les cours d'eau induit l'apparition de mauvais gouts, prolifération bactérienne, odeurs pestilentielles et colorations anormales. Ils ont été évalué qu'une coloration pouvait être perçue par l'œil humain à partir d'une concentration de µg/L. en dehors de l'aspect esthétique, les agents colorants ont la capacité d'interférer avec la transmission de la lumière dans l'eau, bloquant ainsi la photosynthèse des plantes aquatiques [48].

Les dangers que présente la pollution par les colorants peuvent être classés comme suit :

I.3.4. Dangers à long terme :

a. **Persistance:** La détermination de la persistance dans l'environnement des matières colorantes azoïques est complexe et dépend d'un certain nombre de facteurs, y compris de leurs propriétés intrinsèques et des caractéristiques du milieu environnant. De nombreuses matières colorantes, sont conçues pour être durables dans l'environnement, d'où la difficulté de l'épuration par dégradation biologique naturelle. Cette persistance est due principalement à leur réactivité chimique [49].

b. **Bioaccumulation :** Si un organisme ne dispose pas de mécanismes spécifiques, soit pour empêcher la résorption d'une substance, soit pour l'éliminer une fois qu'elle est absorbée, alors cette substance s'accumule. Les espèces qui se trouvent à l'extrémité supérieure de la chaîne alimentaire, y compris l'homme, se retrouvent exposées à des teneurs en substances toxiques (colorants azoïques) pouvant être jusqu'à mille fois plus élevées que les concentrations initiales dans l'eau [50].

c. **Formation des sous-produits de chloration**: Le chlore utilisé pour éliminer les microorganismes pathogènes réagit avec la matière organique y compris les colorants azoïques pour former des trihalométhanes dont les concentrations peuvent atteindre plusieurs centaines de $mg.L^{-1}$. Les sous-produits de chloration sont responsables du développement de cancers du foie, des poumons, des reins et de la peau chez l'homme [51,52].

I.3.5. Mutagénicité / Carcinogénicité

Une étude, effectuée sur le recoupement des DL_{50} avec les classifications chimiques et tinctoriales des colorants, démontre que les colorants synthétiques organiques les plus toxiques sont les colorants diazo et cationiques. Or, le caractère électro-attracteur des groupes azo génère des déficiences électroniques, ce qui rend les azoïques peu disposés au catabolisme oxydatif dans des conditions environnementales aérobies. La toxicité des azoïques due à l'exposition aux colorants et à leurs métabolites n'est pas un fait nouveau. Dès 1895, l'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie textile est reliée à leur exposition prolongée aux colorants azoïques. Depuis, les travaux effectués sur ces colorants azoïques ont démontré que ces composés chimiques présentaient des effets cancérigènes pour l'homme et l'animal [53].

Si la plupart des colorants ne sont pas directement toxiques, une portion significative de leurs métabolites l'est. Leurs effets mutagènes, tératogènes ou cancérigènes apparaissent après dégradation de la molécule initiale en sous-produits d'oxydation. Les effets cancérigènes des composés azoïques s'expriment alors, dans certains cas, indirectement par leurs dérivés aminés. La toxicité des azoïques et de leurs dérivés est accrue par la présence de substituants sur le noyau aromatique, notamment des groupes méthyles [54].

I.4. PRINCIPALES MÉTHODES DE DÉCOLORATION

Les problèmes de pollution chimique de l'eau sont devenus une source de préoccupation importante et un enjeu prioritaire pour tout secteur industriel. Parallèlement, la règlementation en matière de rejets et d'impacts environnementaux devient de plus en plus sévère. Différentes solutions existent et peuvent être appliquées à deux niveaux : le prétraitement ou traitement primaire et le procédé d'épuration (traitement secondaire) [4]. A l'instar des autres pays bien avancés au niveau de la protection de l'environnement, l'Algérie fait son bonhomme de chemin, en promulguant des lois qui contraindraient les industriels en fonction de leur activité à s'équiper d'unités de traitement des eaux usées pour diminuer la charge polluante des effluents avant leur déversement dans les cours d'eau ou dans la mer via les réseaux d'assainissement. Parmi les industries consommatrices d'eau en grande quantité, on trouve celle du textile avec celle de la tannerie en tête de liste. Les secteurs de teintures, de l'impression ou du finissage du textile y occupent une place de choix. Ces activités génèrent une pollution importante en eaux résiduaires fortement chargés en colorants azoïques [55].

Une fois prétraité, l'effluent peut subir un second traitement par voie biologique, physique ou chimique. Plusieurs travaux relatifs aux traitements des rejets liquides des teintureries textiles contenants des colorants azoïques ont été publiés. Les procédés employés pour leur élimination font généralement appel aux techniques de floculation, coagulation [56,57,58,59,60], osmose inverse, oxydation ou réduction chimique [61,62,63,64], dégradation photocatalytique au dioxyde de titane (TiO_2) [65,66,67], et récemment la dégradation enzymatique par la peroxydase L'objectif principal de cette partie est de fournir une mise à jour des informations sur les techniques proposées dans la littérature pour le traitement des effluents industrielles chargés en colorants. Les avantages et les inconvénients de chacun sont présentés et discutés. Par la suite, des exemples récents tirés de la littérature illustrent les diverses caractéristiques des nouvelles technologies utilisées pour la dépollution des eaux telles que les méthodes enzymatiques et plus particulièrement les peroxydases [68,69,70,71,72,73].

I.4.1. Méthodes physiques :

I.4.1.1. Filtration sur membrane

L'effluent passe à travers une membrane semi-perméable qui retient en amont les contaminants de taille supérieure au diamètre des pores, pour produire un perméat purifié et un concentré qui reçoit les impuretés organiques. Parmi les quatre types de procédés, la nanofiltration et l'osmose inverse sont les plus adaptés à la rétention partielle de la couleur et des petites molécules organiques et l'osmose inverse reste la plus répandue. La nanofiltration s'applique surtout au traitement des bains de teinture de colorants réactifs en agissant comme un filtre moléculaire tandis que la microfiltration retient les matériaux colloïdaux tels que les colorants dispersés ou de cuve. Ces procédés, limités dans leurs applications, nécessitent des investissements importants. Le coût du retraitement du concentré est jusqu'à six fois plus élevé que celui de l'effluent non-traité [70].

I.4.1.2. Adsorption :

Elle est considérée parmi les technologies les plus utilisées vue qu'elle est caractérisée par sa simplicité de mise en œuvre et son coût de fonctionnement modéré. La décoloration des effluents issus des industries textiles chargés en colorants peut se faire par ce procédé, elle est résultante de deux mécanismes : adsorption et échange d'ions. Cette méthode est influencée par de nombreux facteurs physico-chimiques tels que : l'interaction colorants-adsorbant, surface d'adsorbant, la taille des particules, la température, le pH et le temps de contact [74].

Il existe actuellement de nombreux exemples d'adsorbants à faible coût et obtenus à partir des déchets industrielles qui sont utilisés pour l'élimination des colorants et de la matière organique colorée. La capacité du matériau à faible coût (écorce, balle de riz, charbon actif, bentonite, argile et les déchets de coton) pour adsorber les molécules des colorants a été largement discutée. L'utilisation de ce procédé est limitée par plusieurs facteurs, tels que la quantité considérable d'adsorbant à mettre dans le contacteur et le temps de contact colorant-adsorbant. La régénération de l'adsorbant est aussi un problème crucial [73].

I.4.2. Méthodes chimiques

Les traitements par voie physique transfèrent le polluant de l'effluent à traiter vers un compartiment récepteur qui devra être, à son tour, régénéré ou détruit. Les procédés de destruction des colorants azoïques reposent sur des techniques chimiques basées sur des réactions d'oxydation. Il en résulte deux grands types de procédés : les procédés d'oxydation avancée (POA) et l'oxydation par voie électrochimique.

I.4.2.1. Procédés d'oxydation avancée (POA)

Parmi les méthodes de traitement chimique, les procédés d'oxydation avancée (AOP) restent les plus fréquemment utilisés. Ceux-ci sont fondés sur la formation d'une entité radicalaire extrêmement réactive : le radical hydroxyle (OH•) qui possède un temps de vie très court, un potentiel d'oxydation élevé et une forte réactivité vis-à-vis de nombreux composés organiques [75]. Les principaux procédés de production du radical hydroxyle seront présentés. Elle se fait le plus souvent par addition des produits chimiques. Les processus de décoloration par oxydation les plus utilisés sont :

I.4.2.1.1. Réaction de Fenton (H_2O_2/Fe^{2+}) :

La réaction de Fenton (réaction) en solution aqueuse est basée sur la décomposition du peroxyde d'hydrogène (agent oxydant) en présence d'ions ferreux pour produire un radical hydroxyle, ce dernier constituant l'espèce oxydante prédominante. Plusieurs travaux ont montré que la combinaison de H_2O_2 et de Fe^{2+}était un oxydant efficace pour une grande variété de substrats organiques, notamment les phénols, les pesticides, les aromatiques polycycliques et des colorants, en particulier les azoïques [76].

$$Fe^{2+} + HO\text{-}OH \ + H^{+} \longrightarrow \ Fe^{3+} \ + \ H_2O + OH\bullet$$

Les micropolluants organiques, notamment les colorants synthétiques, sont ensuite oxydés par le radical hydroxyle selon une cascade réactionnelle complexe. L'étude de dépollution des effluents textiles colorés par le procédé Fenton (système Fe^{2+}/H_2O_2) a été révélée très efficace et plusieurs études ont montré que le taux de minéralisation des colorants synthétiques augmente avec l'augmentation des doses des réactifs et du temps de réaction [77].

Le procédé Fenton est considéré aujourd'hui comme le procédé le plus utilisé pour le traitement d'effluents industriels textiles, mais ce procédé est limité par le manque de régénération du catalyseur qui nécessite généralement un apport constant en réactifs et qui contraint de ce fait à approvisionner en continu le milieu en peroxyde d'hydrogène coûteux. Toutefois, il existe certains colorants ou groupements qui réagissent plus lentement que d'autres, par exemple, les colorants à base d'antraquinone réagissent 100 fois plus lentement que les colorants azoïques [78].

I.4.2.1.2. Ozonation :

L'ozone, oxydant très instable et puissant, qui se décompose rapidement en dioxygène et oxygène atomique et doit être produit impérativement « *in situ* » grâce à l'émission d'une charge électrique sous haute tension dans un courant d'air sec.

En raison de sa forte instabilité, l'ozone réagit avec l'effluent chargé en colorant dans un réacteur de contact de façon rapide et sélective par fission des doubles liaisons puisque O_3 réagit préférentiellement sur les composés insaturés par exemple, -C=C- ou -N=N- d'où les colorants azoïques et aussi sur les structures aromatiques. L'emploi de l'ozone sur les colorants a montré que les effluents chargés réagissent différemment selon leur composition. Les rejets contenant des colorants dispersés et soufrés sont particulièrement difficiles à décolorer, alors que ceux chargés de colorants réactifs, basiques, acides et directs le sont assez rapidement [79].

Bien que le pouvoir oxydant de l'ozone soit élevé, une minéralisation complète par ozonation est très difficile. Le principal désavantage de l'application d'un système d'ozonation aux bains de teinture, outre un investissement et des coûts opératoires élevés imputables à l'énergie électrique consommée et à la maintenance, réside dans la génération de sous-produits de dégradation qui peuvent être à leur tour récalcitrants et toxiques. De plus, l'ozonation est limitée par la très faible solubilité de O_3 dans l'eau: environ 0,1 mM à 293 K et son transfert de masse est un facteur limitant [79].

I.4.2.1.3. Chloration

L'oxydation chimique des effluents chargés en colorant est également possible avec des composés de chlore. Ces ions attaquent le groupe amine de la molécule du colorant qui initie et accélèrent le clivage de la fonction azoïque. Toutefois, pour des raisons environnementales, et comme ce processus nécessite une concentration élevée en chlore dans un milieu ayant un pH très bas et libère des amines aromatiques qui sont cancérigènes et toxiques, tous ces facteurs rendent cette technique d'oxydation parmi les processus les plus interdits universellement [80].

I.4.2.1.4. Photolyse et photocatalyse :

La photolyse est la coupure homolytique de la molécule de peroxyde d'hydrogène sous irradiation ultraviolette pour conduire à deux radicaux hydroxyles :

$$H_2O_2 + h\nu \longrightarrow 2\ {\bullet}OH$$

La dégradation photocatalytique des colorants consiste à éclairer un semi-conducteur avec une source de lumière ultraviolet. Cette configuration entraîne une réaction physico-chimique qui détruit la plupart des polluants non biodégradables présents dans l'eau en les transformant en CO_2 et H_2O. Donc la décomposition photocatalytique des contaminants consiste à irradier un semi-conducteur naturellement ou artificiellement. Parmi les photocatalyseurs les plus communément rencontrés, l'oxyde de titane (TiO_2) présente une stabilité photochimique et une activité photocatalytique favorable au traitement des colorants [81].

Le processus en H_2O_2 semble trop lent, coûteux et peu efficace pour l'application à grande échelle, par contre la combinaison de UV/TiO_2 semble plus prometteuse [82]. Malgré la décoloration par voie photocatalytique est achevée complètement, elle est applicable pour un nombre de colorants très limité dans une installation plus coûteuse. Les inconvénients majeurs de ce processus est le manque de connaissance des produits de dégradation générés, les produits finaux pouvant être plus toxiques que les colorants de départ et la durée de vie et l'efficacité et de la lampe est très limitée [83].

I.4.2.2. Procédés électrochimiques

L'électrolyse est une réaction électrochimique basée sur le passage du courant entre deux électrodes (anode et cathode). Dans le cas d'effluents issus d'industries textiles, le courant électrique créé entre les deux électrodes permet de fragmenter les molécules de colorants qui perdent alors leur couleur. L'utilisation de cette méthode d'oxydation est applicable que pour des effluents qui présentant une conductivité suffisante et une concentration en sel assez importante [84].

I.4.3. Méthodes microbiologiques

L'application des microorganismes pour la biodégradation des colorants synthétiques est une méthode intéressante qui consiste à utiliser des cultures biologiques (bactéries, champignons) ayant la capacité de dégrader ces substances en les utilisent comme source de carbone. Grâce à leurs capacités d'adaptation et de mutation, les microorganismes comme les bactéries sont à la base de tous les traitements d'épuration biologique actuels qui ont un rôle essentiel dans la lutte contre la pollution. Il faut noter que les procédés d'épuration sont multiples et que leur conception peut être très variée. Cependant, tous ces procédés biologiques sont fondés sur le même principe que tout polluant organique biodégradable peut être utilisé comme élément nutritif et/ou comme source énergétique pour les microorganismes vivants. Ils peuvent assimiler les matières organiques et les transformer en matière vivante [85].

Les colorants azoïques sont transformés par certaines variétés de microorganismes, incluant des bactéries (aérobies et anaérobies) et des champignons. Ces derniers ont généralement des croissances et des cinétiques de décoloration lentes, ce qui limite leurs performances vis-a-vis de ces colorants. Si la biodégradation des colorants azoïques dans des conditions anaérobie a été très largement étudiée, puisque elle permet d'économiser de l'énergie, de produire moins de boues et d'éliminer en particulier les polluants minéraux, la biodécoloration en culture aérée (bien oxygénée) reste encore peu étudiée et limitée à certaines espèces de bactéries. Ces dernières échappent aux conditions générales d'azoréduction en anaérobiose. De nombreuses études ont montré que l'oxygène est un facteur limitant de la biodégradation des colorants azoïques [40].

Grand nombre d'espèces a été testé pour la dégradation de divers colorants. La capacité de *Kurthias p* de décolorer Magenta, violet de Crystal, vert de Malachite, Parasaniline et vert Brillant a été reporté [86]. La capacité de la souche *Pseudomonas* pour la décoloration de divers colorants a été aussi étudié en détail pour les colorants azoïques (Violet acide 7, Rouge acide151 et Noir réactif 5) qui sont dégradés avec un rendement élevé (>90%).De même pour l'indigo Carmin, Rougeacide183 (complexe chromeux) et les antraquinones (bleu Réactive 2 et Vert acide 27) [87]. Par ailleurs, il a été démontré que *P. mendocina* peut effectivement décolorer les effluents textiles contenant le Méthyle violet, avec l'utilisation d'un réacteur à biofilm fixe [88].

L'inconvénient majeur du procédé est dû à la biodégradation incomplète, voire inefficace dans le cas de certains colorants azoïques récalcitrants. Les coûts d'investissement et de fonctionnement peuvent être élevés qui demandent des installations et des aménagements, nécessite d'oxygéner les cultures et de maintenir des conditions optimales). Les méthodes microbiologiques demandent des opérations en amant (stérilisation du réacteur, préparation de milieu de culture) et en aval (séparation de la biomasse et de sous-produits). La dégradation des colorants s'effectue dans un bioréacteur contrôlé chargé par un milieu de culture [88].

I.4.4. Méthodes enzymatiques

Les efforts de recherche remarquable ont été faits pour le développement et la mise en œuvre de nouveaux traitements efficaces et écologiques capables de réduire, voire d'éliminer, les composés toxiques dans les effluents avant leur rejet dans l'environnement. Les méthodes enzymatiques semblent être une technologie prometteuse pour cette tâche, avec un impact mineur sur les écosystèmes par rapport aux méthodes physico-chimiques [6]. L'applicabilité de cette technologie a été démontrée explicitement dans un grand nombre de publications et de brevets enregistrés à ce jour [89].

Cette approche est considérée comme une technologie prometteuse, car il est très spécifique, rentable, respectueuse de l'environnement, et ne produisant pas de boues [90]. La transformation enzymatique de colorants synthétiques peut être décrite comme la conversion des molécules de colorant par des enzymes en des produits plus simples et généralement incolores. Les peroxydases ont beaucoup attiré l'attention des chercheurs en dernières décennies en raison de leur capacité à oxyder les composés de nature phénolique comme les colorants et les phénols ainsi que les polluants environnementaux très récalcitrants [8]. Plusieurs enzymes ont été testés pour déterminer leur potentiel catalytique dans le traitement des eaux usées synthétiques et réelles. Le tableau I-6 donne quelques enzymes utilisés dans la dégradation de certains colorants azoïques.

Tableau I-6 : Quelques enzymes intervenant dans la dégradation de certains colorants azoïques.

Substrat : colorant	Enzyme	Source d'enzyme	Réf
Jaune acide 17, Chromotrope 2R, Crocein Orange G, Méthyle Orange, Nouveau Coccine, Orange II, Tartrazine et Tropaeollin	Laccase	*Streptomyces cyaneus* CECT 3335	[91]
Bleu Remazol RR, Cibacron Rouge FN-2BL , Bleu 4BL et Rouge BWS	Laccase	*Trametes versicolor*	[92]
Orange Acide 6, Orange Acide 7, Méthyle Orange, rouge de Méthyle	Oxydoréductases des boues méthanogènes.	Mélange de bactéries	[93]
Rouge Congo, Orange G, Orange IV	Manganèse peroxydase	white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17	[94]
Rouge Direct 80,Bleu Mordant 9 Mélange des deux colorants	Lignine peroxydase Manganèse peroxydase	white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*	[95]
Jaune Direct 106	Peroxydase	*courgette Cucurbita pepo*	[96]
Effluents textiles contenant des colorants azoïques	Peroxydase	Raifort *Armoracia rusticana*	[97]
Tartrazine et Ponceau	Azoreductase	Algues vertes	[98]
Jaune Réactive, Noir Réactive, Rouge Réactif et Bleu Direct	Azoreductase	*Staphylococcus arlettae*	[99]

I.4.5. Résumé comparatif des procédés de traitement des colorants

Bien que les méthodes physiques, chimiques, physicochimiques et microbiologiques sont multiples, elles se sont avérées très coûteuses, peu efficaces compte tenu des normes exigées et parfois nécessitent un équipement bien sophistiqué. Ce constat a permis aux chercheurs et aux industriels de s'orienter vers la recherche d'autres méthodes qui soient plus efficaces et moins coûteuses : ce sont les procédés enzymatiques. Après un bref aperçu des principes de fonctionnement et le type d'application des procédés de dépollution des rejets de colorants, Le tableau I-7 résume leurs principaux attraits et inconvénients pour l'élimination des colorants.

Tableau I-7: Comparaison de technologies physiques, chimiques, microbiologiques et enzymatiques de dépollution des effluents chargés de colorants synthétiques.

Procédé		Exemple	Avantages	Inconvénients	Réf
Physique	*Filtration sur membrane*	Osmose inverse Nanofiltration Microfiltration Ultrafiltration	Utilisation simple et rapide Pas d'addition de produits chimiques Faible consommation énergétique Réduction de la couleur Traitement de grands volumes	Investissement important Sélectif Encrassement rapide des membranes par colmatage Pré et post-traitements nécessaires	[100]
	Adsorption	Charbon actif Silice	Réduction efficace de la couleur Technologie simple Faible coût d'utilisation pour certains adsorbants	Investissements et coûts de fonctionnement élevés Lent et limité en volume Régénération onéreuse des adsorbants (voire impossible) Sélectif Formation de boues	[4,40]
Chimique	*Fenton*		Opération simple Oxydant puissant	Coûts élevés Sous-produits d'oxydation inconnus	[4,40]
	Ozonation		Diminution nette de la coloration Traitement de gros volumes	Investissements et coûts de fonctionnement élevés Efficacité limitée pour certains colorants Sous-produits d'oxydation inconnus	[4,40]
	Chloration		Décoloration rapide et efficace	Formation de sous-produits de chloration (trihalométhanes cancérogènes)	[4,40]
	photocatalyse	TiO_2/UV		Manque de connaissance des produits de dégradation Produits finaux plus toxiques que les colorants de départ	[4,40]
Electrochimique	*Coagulation, floculation*	$Al(OH)_3$ $Ca(OH)_2$ $FeCl_3$ Polyélectrolytes	Equipement simple Décoloration relativement rapide Réduction significative de la DCO	Formation de boues Adjonction obligatoire de produits chimiques Fonctionnement onéreux Coagulants non réutilisables Réduction spécifique de la couleur Peu d'information sur la réduction de DBO et DCO	[101]

Tableau I-7 (à suivre)

Procédé		Exemple	Avantages	Inconvénients	Réf
Microbiologique	*Aérobie* *Anaérobie*	Champignon, algue, levure actinomycète et bactéries	Acceptable par le public Peut réduire certains colorants	Gestion et maintenance de microorganismes Nécessité des surfaces de bassin très grandes pour les grandes quantités d'effluents colorés Procédé lent et production de boues Produits de dégradation inconnus Stabilité chimique des colorants et résistance aux attaques microbiologiques.	[40,88]
Enzymatique	*Libre* *immobilisée*	Peroxydase Laccase azoréductase	Extraction et purification simple et facile Simplicité de mécanisme d'action. Régénérabilité du biocatalyseur. Rapidité de transformation. Flexibilité de fonctionnement sous différentes conditions opératoires. Facilité de contrôle des paramètres opératoires. Processus moins coûteux Pas de régénération des sous-produits nocifs. Possibilité de détection et de séparations des produits.	Nécessite un prétraitement de l'effluent	[102]

Conclusion

Cette étude bibliographique montre que les colorants synthétiques organiques sont des composés utilisés dans de nombreux secteurs industriels. On les retrouve ainsi dans le domaine automobile, chimique, papeterie et plus particulièrement le secteur textile, où toutes les gammes de nuance et de familles chimiques sont représentées. Ces données bibliographiques mettent en évidence la nécessité de la dépollution de ces effluents chargés par les colorants une fois rejetés dans l'environnement. Les méthodes physiques basées sur l'adsorption, photodégradation, oxydation chimique, coagulation et précipitation consomment habituellement une quantité importante des produits chimiques qui conduisent parfois à une pollution secondaire et à un volume important de solides récupérés.

En plus, du fait de la composition très variable de ces eaux et à cause de la complexité de la manipulation des produits chimiques, la plupart de ces méthodes conventionnelles commencent à s'avérer insuffisantes pour un traitement simple et efficace et nécessitant une consommation minimale en réactifs. En effet, afin d'obtenir une plus grande efficacité, les procédés physiques et les traitements chimiques sont souvent complémentaires, intimement liés et non concurrentes, associent souvent en deux méthodes. On trouve des travaux basés sur des systèmes mixtes comme les procédés oxydation/adsorption, membrane/électrolyse ou encore oxydation/ nanofiltration.

Une technique de traitement adaptée aux colorants doit avant tout dégrader totalement et complètement les molécules afin d'éviter la formation de sous-produits plus dangereux que les composés initiaux. Les procédés présentés dans ce chapitre ne répondent pas à cette attente car ils sont pour la plupart non destructifs. Mais un autre type de procédé tel que les procédés enzymatiques répondent à ces critères grâce à l'utilisation des biocatalyseurs puissants appelés : peroxydases capables de décolorer la solution par destruction des groupes chromophores et réduire le taux de matière organique non biodégradable. Cette enzyme et ces procédés seront abordés dans le chapitre suivant.

Chapitre II. Élimination des colorants azoïques dans des bioréacteurs à peroxydase immobilisée

Introduction

La mise au point de méthodes efficaces a fait et fait encore l'objet d'un nombre considérable de recherches. Il existe, dans la littérature, une multitude de procédés de dépollution des effluents issus des industries consommatrices des colorants. En effet, il est possible à l'aide de procédés adaptés de traiter les effluents industriels colorés qui ont la particularité d'être à la fois non biodégradable et dangereux pour l'environnement. Cependant, beaucoup ne sont pas exploitables à l'échelle industrielle pour des raisons technologiques mais surtout économiques.

Il apparaît donc intéressant de mettre au point des traitements alternatifs, notamment par voie enzymatique, qui ont l'avantage d'être moins coûteux, moins polluants et plus efficaces car plus spécifiques. La spécificité de leur action, leur fonctionnement dans des conditions de températures relativement économique en font des catalyseurs très compétitifs face à ceux des procédés chimiques industriels classiques. Ces molécules présentent également une grande importance économique, leur utilisation aux processus chimiques diminue la formation des produits nocifs dans l'environnement et réduit ainsi le coût de traitement [103]. Néanmoins, la continuité du procédé enzymatique impliquant la régénération (recyclage) du catalyseur, la stabilité des enzymes dans les conditions fluctuantes de température ou de pH, ainsi que la possibilité d'inhibition ou la décélération de la réaction par excès de substrats sont des facteurs primordiaux pour la garantie de compétitivité vis à vis des procédés chimiques ou biologiques [104]. Ces contraintes peuvent être surmontées grâce à la technologie de l'immobilisation ou la fixation de l'enzyme sur un support, qui a pour but d'augmenter sa stabilité, de conserver son activité maximale et faciliter sa réutilisation en procédés batch ou continu.

Ce chapitre se propose de démontrer l'intérêt des méthodes enzymatiques. Des généralités sur les peroxydases et plus particulièrement sur les bioréacteurs à enzymes immobilisées seront succinctement abordées dans les paragraphes suivants. Enfin, la dégradation des colorants dans des bioréacteurs à lit fixes par la peroxydase immobilisée, qui fait l'objet de notre travail, sera abordée plus spécifiquement.

II.1. LA PEROXYDASE

II.1.1. Définition et constitution de la peroxydase

La famille des peroxydases constitue un paradoxe dans le monde de la recherche. C'est une famille d'enzymes identifiée de très longue date, dont le rôle est admis comme étant indispensable à la vie aérobie. Malgré toutes les études concernant cette famille de protéines, il semble encore très difficile d'associer une fonction biochimique spécifique à aucun des membres de cette famille, tout en sachant qu'elles sont impliquées dans un très grand nombre de processus physiologiques. La peroxydase est une enzyme oxydoréductase qui a notamment pour fonction de décomposer les peroxydes d'hydrogènes, ce qui lui vaut son nom. Les deuxièmes substrats sont les électrons des composés phénoliques comme les phénols, les colorants et les anilines. Cette fonction des peroxydases a été découverte pour la première fois en 1855 dans l'oxydation du gaïacol par les peroxydases en présence du H_2O_2 [105].

II.1.2. Historique

En 1810, Planche décrit l'apparition d'une couleur bleue, sur des morceaux de racine de raifort incubés dans de la teinture de Gaïac. En 1818, Thénard fut le premier à décrire les propriétés de l'eau oxygénée (H_2O_2) et Schonbein, en 1855, décrit l'oxydation de certains composés organiques, catalysée par des extraits issus de plantes ou d'animaux, en présence de solutions diluées de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le nom de peroxydase fut donné en 1898 par Linossier, à un extrait de pus humain présentant une telle activité [106]. Les fameuses peroxydases de raifort furent l'outil de base des premiers travaux moléculaires sur les peroxydases végétales et c'est en 1976, grâce aux travaux de Braithwaite, d'une part, et de Welinder, d'autre part, qu'on a pu avoir une première image cristalline d'une de ces enzymes ainsi que la première séquence nucléotidique d'un messager codant pour une peroxydase de Tabac. C'est principalement sur la base de ces travaux, qu'aujourd'hui les données moléculaires concernant les peroxydases végétales ont pu s'accumuler de manière plus que significative [107].

II.1.3. Structure chimique de la peroxydase

Les peroxydases sont présents dans les animaux, les plantes et les microorganismes, ayant un poids moléculaire entre 30 à 150 kDa combinées avec une ferriporphyrine [108]. La peroxydase la plus répandue dans le monde vivant est une protéine héminique c'est-à-dire qu'elle contient une partie non protéique plane l'hème [109]. Le site actif des peroxydases est centré autour de l'hème qui est une protoporphyrine IX associée à un atome de fer ferrique, Fe^{3+} (figure II-1). Au repos, cet atome possède quatre liaisons avec des atomes d'azote de la protoporphyrine et une liaison avec le groupement

imidazole de l'histidine 170 (numérotation dans le cas de HRP), très conservée chez les peroxydases. Sur le côté distal de l'hème se trouvent trois acides aminés conservés : arginine 38, phenylalanine 41 et histidine 42. Ces trois résidus servent de site de fixation de l'H_2O_2 et interviennent dans la catalyse. Ces quatre acides aminés sont situés sur deux hélices α conservées, parallèles au plan de I 'hème : I 'hélice β (Arg 38, Phe 41 et His 42) et l'hélice F (His 170). Sur le côté proximal, un aspartate conservé (Asp 247) établit une liaison hydrogène avec l'histidine 170 et dont le rôle est important dans le mécanisme de réaction. Enfin plusieurs molécules d'eau présentes au niveau du site actif établissent un réseau de liaisons hydrogènes entre elles et avec l'hème et les acides aminés proches stabilisant ainsi la structure (figure II-2-b) [108].

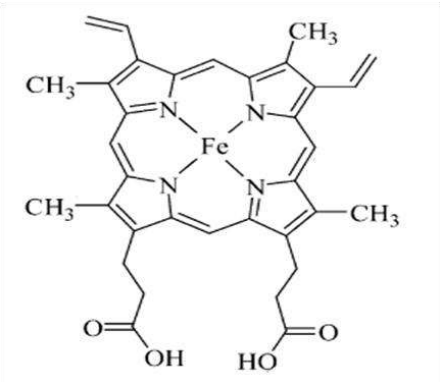


Figure II-1: Structure chimique de l'hème [110].

Les travaux de Welinder [111], sur la cristallographie des peroxydases ont permis de mettre en évidence que toutes les classes de peroxydases eucaryotes avaient des structures tridimensionnelles assez similaires. La peroxydase de raifort ou le radis noir (très connu par Horse Radish peroxidase (HRP)) a été parmi les enzymes les plus étudiées [109]. La figure II-2 présente la structure tridimensionnelle de la peroxydase de raifort ainsi son site actif et les acides aminés impliqués dans la catalyse.

II.1.4. Famille des peroxydases

Les peroxydases sont des enzymes à hèmes constituant une très grande famille multigénique, dans laquelle on distingue trois classes différentes basées sur leurs propriétés structurales et catalytiques [112]:

- *Classe I* : Strictement intracellulaire (EC 1.11.1.5.6/.11), Elle renferme les peroxydases d'origine procaryotique dont le cytochrome c peroxydase de *Saccharomyces cerevisiae*, les

ascorbates peroxydases et les catalase-peroxydases bactériennes. Ce sont toutes des peroxydases intracellulaires, non glycosylées, sans calcium ni pont disulfure.

– *Classe II* : Regroupe les peroxydases extracellulaires fongiques, secrétées par les champignons (EC 1.11.1.13/.14). Ces enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine sont présentes chez un grand nombre de champignons notamment les basidiomycètes. Les peroxydases de la classe II sont organisées en deux types : les lignine-peroxydases (LiP), qui oxydent un grand nombre de composés aromatiques non phénoliques dérivés de la lignine ; les manganèse peroxydases (MnP), qui constituent le deuxième type majeur de peroxydases produites par les champignons, et plus particulièrement ceux de la pourriture blanche, oxydent la lignine et les composes phénoliques qui en dérivent via l'oxydation du Mn^{2+} en Mn^{3+} qui sert d'intermédiaire d'oxydoréduction.

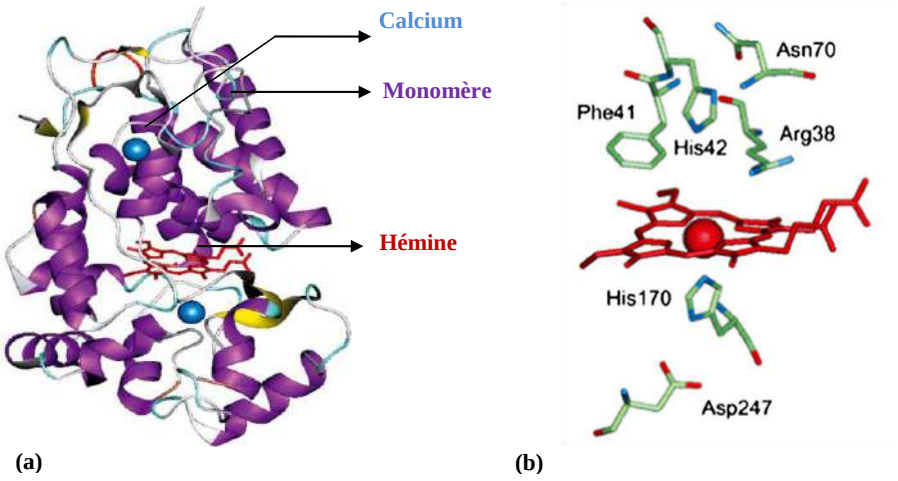


Figure II-2 : Structure tridimensionnelle : a) de la peroxydase de raifort (HRP) b) de site actif et les acides aminés impliqués dans la catalyse [110].

– *Classe III* : regroupe les peroxydases végétales (EC 1.11.1.7) : secrétées par les cellules des plantes, sont également des glycoprotéines monomères ayant des fonctions spécifiques dans des tissus multiples tel que: élimination de H_2O_2 à partir de chloroplastes et cytosol, oxydation des composés toxiques, biosynthèse de la paroi cellulaire, auto-défense envers les blessures, biosynthèse de l'éthylène, etc. Les peroxydases les plus connus de cette classe se trouvent en abondance dans le raifort, le navet, le radis, la courgette et le soja. Ces peroxydases sont les plus étudiés pour le traitement des effluents colorés grâce à leurs propriétés biocatalytiques,

leur grande spécificité vis-à-vis une large gamme du substrat, leur meilleure stabilité et le plus important la facilité d'extraction à partir des matières végétales [113].

II.1.5. Mécanisme réactionnel de la peroxydase

Le cycle catalytique de la peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène est simplifié sur la figure II-3. Tout d'abord, Le groupement hème de l'enzyme qui contient un atome de fer tétravalent réagit avec une molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner le composé I. Ce composé de charge positive est un cation radical porphyrine. Au cours de cette étape de la réaction, le peroxyde d'hydrogène est réduit à l'eau tout en oxydant l'enzyme. Un équivalent oxydant réside sur le fer, générant l'oxyferryl (Fe(IV)=O) comme intermédiaire.

$$\text{Native hème} + H_2O_2 + e^- + H^+ \longrightarrow \text{Composé I} + H_2O$$
$$\text{Composé I} + RH_2 \longrightarrow \text{Composé II} + RH\cdot + e^- + H^+$$
$$\text{Composé II} + RH_2 \longrightarrow \text{Native hème} + RH\cdot + H_2O$$
$$RH\cdot + RH\cdot \longrightarrow HR\text{-}RH \text{ (ou } RH_2 + A_{Ox})$$

Figure II-3 : Mécanisme d'oxydation des composés phénoliques en présence de peroxyde d'hydrogène par la peroxydase [114].

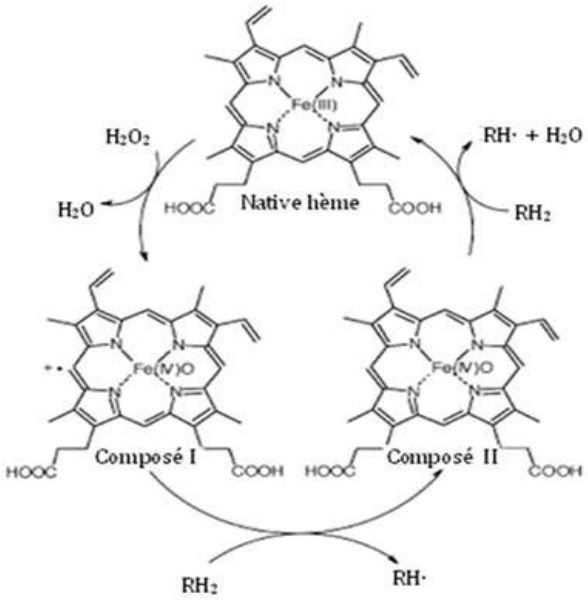


Figure II-4 : Mécanisme réactionnel de la peroxydase [114].

Le composé I oxyde le substrat (RH_2) pour donner le radical (RH•). Il subit une seconde oxydation générant le composé II neutre qui contient un centre oxyferryl coordonné à un ligand porphyrique normal (dianionique). Le composé II ainsi obtenu réagit avec une seconde molécule de RH_2 et libère simultanément de l'eau. Finalement, le composé II est réduit à la forme ferrique correspondant à l'état natif initial de l'enzyme [114]. La figure II-4 présente le mécanisme d'oxydation des composés phénoliques y compris les colorants:

II.1.6. Application de la peroxydase dans la dégradation des colorants

Les peroxydases sont parmi les enzymes les plus utilisées pour éliminer les composés toxiques de l'environnement et surtout les composés aromatiques en raison de leurs propriétés intéressantes comme la disponibilité, la spécificité vis-à-vis d'une large gamme de substrat et la stabilité aux pH et aux températures extrêmes. La peroxydase a la capacité de dégrader ou de transformer les colorants en milieu aqueux en composés insolubles facilement séparables par filtration ou par précipitation. Leur action catalytique en présence de peroxyde d'hydrogène sous des conditions modérées de pH et de température, provoque un clivage des cycles aromatiques d'où l'on obtient la disparition de la couleur [115]. Cette enzyme a montré son efficacité non seulement dans la dégradation des colorants mais aussi les phénols, qui constituent pour la plupart des colorants, la matière première dans le procédé de synthèse, et qui par conséquent est susceptible d'être retrouvé dans les rejets aqueux de l'industrie textile [116]

Plusieurs travaux scientifiques ont mis la lumière sur l'utilisation des peroxydases de différentes sources pour le traitement des effluents colorés. Les peroxydases végétales extraites à partir des plantes possèdent également des grandes potentialités pour dégrader les colorants azoïques. Elles ont pris une part importante dans le traitement enzymatique des effluents colorés de différentes classes tinctoriales. Comparées aux enzymes d'origine microbienne, elles sont plus faciles à extraire et à mettre en œuvre. Le navet, le radis noir, toute la famille des Brassicassés et les graines de Soja sont les sources qui ont été les plus étudiées et utilisées pour le traitement des rejets industriels chargés en colorants [117].

Le mécanisme d'oxydation des colorants azoïques par la peroxydase est proposé dans la figure II-5Un électron du radical phénolique de la molécule du colorant azoïque est oxydé en deux fois, successivement, par la peroxydase en présence du peroxyde d'hydrogène pour donner un ion carbonium du cycle aromatique du colorant. Ensuite, une molécule d'eau réagit avec le carbone phénolique ionisé portant la liaison azoïque en formant un intermédiaire hydroxyle instable qui sera décomposé en quinone et amidophenyldiazine. Ce dernier composé est aussi oxydé mais cette fois par l'oxygène en donnant un radical phenyldiazène qui conduit après l'élimination du nitrogène à la

formation d'un radical phénolique oxydé finalement par l'oxygène en donnant un produit non toxique. Ce mécanisme conduit à la détoxification des colorants azoïques où aucune amine aromatique n'est formée [114].

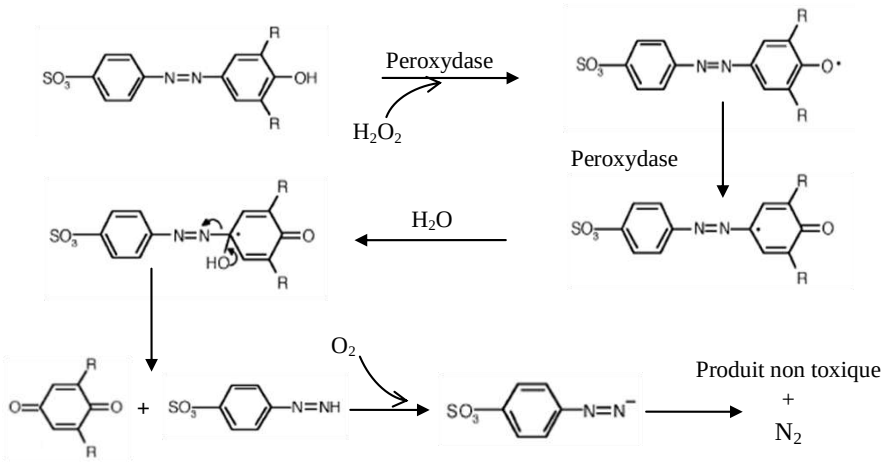


Figure II-5 : Mécanisme du clivage de la fonction azo des colorants par la peroxydase [114].

Bunia et al [118], ont montré l'efficacité de la peroxydase de raifort noir (HRP) dans la dégradation de certains colorants azoïques très utilisés industriellement. Ils ont prouvé sa spécificité vis-à-vis de plusieurs colorants tel que : bleu Remazol et rouge cibacron. Pour le bleu Remazol, la peroxydase a donné une meilleure activité enzymatique à pH acide 2.5 qu'à pH neutre. Cette source végétale a été largement utilisée dans le traitement des colorants de différentes classes tinctoriales. Le tableau II-1 résume quelques travaux démontrant l'efficacité de la peroxydase extraite de différentes plantes dans la dégradation des colorants et des effluents colorés issus principalement de l'industrie textile.

Le navet, un légume bon marché (comparé au HRP) cultivé dans divers pays dans le monde, présente une source contenant une activité peroxydasique importante [119]. La décoloration de quelques colorants acides par la peroxydase de navet a été significativement achevée en présence de 1-hydroxybenzotriazole (HOBT). La dégradation totale a été obtenue après une heure de réaction pour un pH de 5.0 et une température de 40°C [120]. Matto et Husain ont pu dégrader cinq colorants azoïques directs, très utilisés dans l'industrie textile, et par addition de divers médiateurs rédox par utilisation de la peroxydase extraite du navet et purifiée par fractionnement avec le sel sulfate d'ammonium. Une décoloration totale des colorants et leur mélange à été réalisée à pH 5.5 et une température de 30°C en présence de 0.6 mM de HOBT et acide Violurique [121].

Tableau II-1 : Dégradation des colorants et des effluents par la peroxydase des plantes

Source d'enzyme	Colorant /Effluent	Conditions expérimentales et résultats	Réf
Navet	Cinq colorants acides	Dégradation de 62% à 100% pour des concentrations en colorant de 40 à 170 mg/L en présence de 2.0 mM HOBT à pH5.0 et T=40°C.	[120]
	Colorants directs	Décoloration est en maximum en présence de 0.6 mM d'un oxydoréducteur à pH5.5 et à T=30°C	[121]
	Effluent textile	Les effluents textiles de couleur rouge et bleu sont éliminés avec un rendement de 75 à 80 % pour une concentration de l'enzyme 0.423 UI/mL à pH 5.0 et T=40°C.	[122]
Raifort noir (HRP)	bleu Remazol et rouge cibacron	Pour le bleu Remazol, la peroxydase a donné une meilleure activité enzymatique à pH acide 2.5 qu'à pH neutre	[118]
	Orange II	Efficacité de dégradation de plus de 90% du colorant dans un système continu pendant 36h	[123]
	Jaune direct 12	Capacité d'oxydation augmente avec l'augmentation de la concentration de l'enzyme et H_2O_2 à pH 4.0	[124]
	Remazol Turquoize Blue G, Lancet Blue 2 R	Le taux de conversion de Remazol Turquoize Blue G et Lancet Blue 2 R est successivement 59% et 94%. Pour l'effluent textile, la décoloration était 52%. Le test de toxicité envers *Daphnia magna* a montré une réduction de la toxicité après traitement enzymatique.	[125]
	Noir acide 10BX	L'enzyme immobilisée dans le gel acrylamide donne une meilleure d'efficacité d'élimination si en le comparant avec celle immobilisée dans l'alginate grâce aux limitations diffusionnelles et l'enzyme libre.	[126]
Tomate	Colorants directs	Dégradation maximale des colorants à pH6.0 et T=40°C.	[127]
	Effluent textile	Décoloration de l'effluent textile rouge et bleu est respectivement 69% et 59% à 0.705UI/mL de l'enzyme, pH6.0 et T=40°C.	[122]
Courgette	Jaune direct 106	Les conditions physicochimiques optimales sont : pH=2.0 et T=20°C avec l'enzyme libre et immobilisée. Pour l'enzyme libre $[H_2O_2]$=1mM, [col]=50mg/L, t=2min, R=87%. Cependant avec l'enzyme immobilisée $[H_2O_2]$=100mM, [col]=80mg/L, t=15min, R=75%	[96]
Gains de soja	Jaune direct 11	Elimination de 48% du colorant pendant 90 min	[128]
Radis blanc	Rouge réactif 120 Bleu réactif 171	Décoloration maximale entre 56–81% à pH 5.0 et T=40°C pendant 1 h en présence de 1.0 mM de HOBT	[129]

Tableau II-1 (à suivre)

Source d'enzyme	Colorant /Effluent	Conditions expérimentales et résultats	Réf
Courge amère	Effluent textile	Décoloration maximale de 70% en présence de 0.1 mM de HOBT à pH 5.0 et T=40°C et une décoloration de plus de 90% de l'effluent après 3h de traitement dans un système batch. L'enzyme immobilisée donne 59% de dégradation après sa dixième réutilisation	[71]
	Rouge disperse 17 et marron disperse 1	Ces colorants sont dégradés successivement avec un taux de 90% et 65% pour des concentrations 25 à50 mg/L en présence de 0.1mM de HOBT à pH3.0, T=37°C et t=1h.	[130]
	21 colorants et leur mélange	Dégradation de 7 à 100% pour des concentrations de colorant entre 50 à 200 mg/L en présence de 0.1 mM de HOBT, 0.6mM de H_2O_2, pH=5.7, T=37°C et t=1h.	[131]

II.2. LES ENZYMES ET LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

Les innombrables réactions biochimiques différentes dont la matière vivante est le siège sont presque sous la dépendance de catalyseurs biologiques remarquables appelés enzymes. Les enzymes sont des protéines douées d'un énorme pouvoir catalytique, accélérant la vitesse des réactions jusqu'à 1016 fois la vitesse des réactions non catalysées, la spécificité de leur action, et de leur fonctionnement dans des conditions de températures relativement économique en font des catalyseurs très compétitifs face à ceux des procédés chimiques industriels classiques [132,133]. Selon le type des réactions catalysées, les enzymes sont classées successivement en *Oxydoréductases, Transférases, Hydrolases, Lyases, Isomérases, et Ligases* [103]. Les enzymes sont influencé par des paramètres physiques et chimiques tel que : *le pH, la température, La concentration du substrat et d'enzyme, les inhibiteurs et Les activateurs* [134].

II.2.1. Réactions enzymatiques à un seul substrat :

L'équation de Henri qui est à l'origine de l'équation de vitesse de Michaelis-Menten repose sur l'observation suivante : la vitesse initiale d'une réaction est directement proportionnelle à la concentration de la préparation enzymatique, mais augmente de manière non linéaire avec la concentration du substrat, jusqu'à une vitesse maximale limite. En 1913, Lenor Michaelis et Maude Menten, reprenant un travail de Victor Henri, firent l'expression de base de la cinétique enzymatique : Il est alors possible d'établir l'équation de Michaelis et Menten [104,135] :

$$\mathbf{V_0} = \frac{\mathbf{V_{max}[S]_0}}{\mathbf{K_m + [S]_0}} \qquad \textbf{(II-1)}$$

Où $\mathbf{V_0}$ et $\mathbf{[S]_0}$ sont respectivement la vitesse initiale de la réaction et la concentration initiale du substrat. $\mathbf{V_{max}}$ est la vitesse maximale de la réaction qui permet d'obtenir la constante catalytique de la réaction lorsque la concentration des sites actifs $[E]_T$ est connue car $V_{max} = k_{cat}[E]$. La constante catalytique (K_{cat}) est également appelée le **turnover number** d'une enzyme car elle est égale au nombre de molécules de substrats converties en produit par unité de temps par une seule molécule d'enzyme à saturation. $\mathbf{K_m}$, est appelée la constante de Michaelis. Pour la plupart des enzymes, la valeur de K_m dépend de l'affinité l'enzyme vis-à-vis le substrat [136]. L'équation de Michaelis-Menten décrit une hyperbole équilatère comme celle représentée dans la figure II-6 :

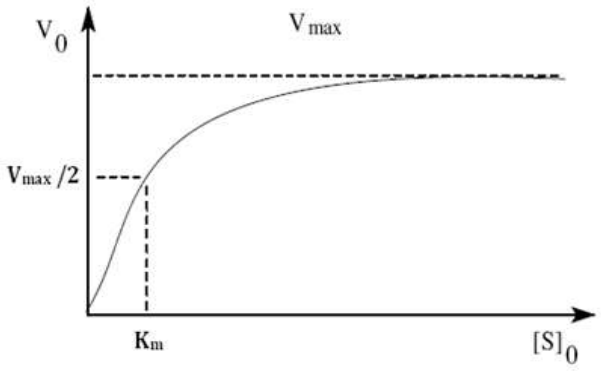


Figure II-6 : Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration initiale du substrat pour une réaction de Michaelis-Menten [137].

Il existe plusieurs moyens de déterminer les paramètres de l'équation de Michaelis-Menten. Pour des concentrations en substrat [S] très élevées, la vitesse initiale V_0 approche de manière asymptotique $V_{max.}$ Cependant, il est pratiquement très difficile de mesurer V_{max} avec précision d'après des tracés directs de V_0 en fonction de $[S]_0$ comme celui de la figure II-6. Même pour $[S]_0 = 10K_m$, l'équation montre que V_0 n'est égale qu'à 91% de V_{max} ce qui fait que la valeur obtenue par extrapolation sera presque certainement sous-estimée. Une méthode plus précise pour déterminer les valeurs de V_{max} et de K_m, qui a été formulée par Hans Lineweaver et Dean Burk, utilise les inverses de l'équation : Il s'agit d'une relation linéaire entre $\frac{1}{V_0}$ et $\frac{1}{[S]_0}$. Si l'on porte graphiquement ces valeurs, on obtient la *représentation Lineweaver-Burck* appelée *représentation en double inverse* [132,133] (figure II-7) :

$$\frac{\mathbf{1}}{\mathbf{V_0}} = \frac{\mathbf{K_m}}{\mathbf{V_{max}}}\left(\frac{\mathbf{1}}{\mathbf{[S]_0}}\right) + \frac{\mathbf{1}}{\mathbf{V_{max}}} \qquad \textbf{(II-2)}$$

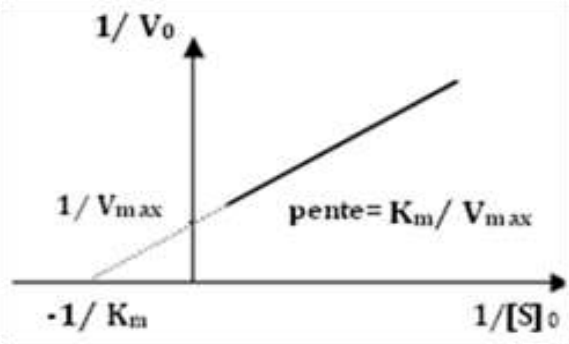


Figure II-7 : Représentation graphique en double inverse selon Lineweaver-Burck [132].

II.2.2. Inhibition par excès du substrat

Pour certains enzymes, il est possible qu'une seconde molécule de substrat se fixe sur le complexe enzyme-substrat, ES, pour donner un complexe inactif, SES. Le mécanisme est analogue à celui qui est habituellement envisagé pour expliquer l'inhibition incompétitive, et l'équation de vitesse a la forme suivante :

$$\mathbf{V_0} = \frac{\mathbf{V'[S]_0}}{\mathbf{K'_m}+\mathbf{[S]_0}\left(\mathbf{1}+\frac{\mathbf{[S]_0}}{\mathbf{K_{si}}}\right)} = \frac{\mathbf{V'[S]_0}}{\mathbf{K'_m}+\mathbf{[S]_0}+\frac{\mathbf{[S]_0^2}}{\mathbf{K_{si}}}} \qquad \textbf{(II-3)}$$

Où les paramètres V' et K'_m sont satisfait aux conditions habituelles des paramètres de Michaelis et Menten. La courbe de V_0 en fonction de $[S]_0$ est représenté dans la figure II-8, avec le graphique correspondant de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]_0$; ce dernier graphique n'est pas une droite mais adopte l'allure d'une parabole. Toutes fois, si K_{si} est beaucoup plus grand que K'_m (comme c'est habituellement le cas), il est suffisamment linéaire aux faibles valeurs de [S] pour que V' et K'_m soient estimés à partir de celui-ci de la façon habituelle [138].

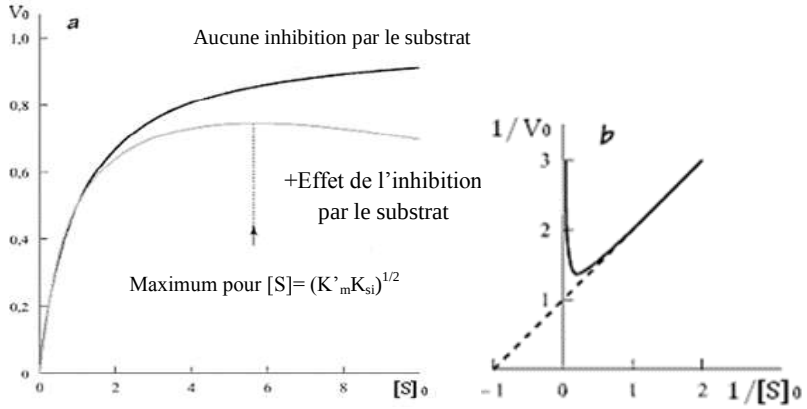


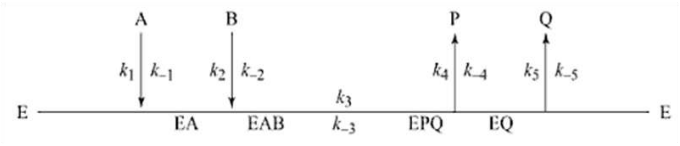
Figure II-8: Représentation graphique de l'inhibition par excès de substrat, (a) : Variation de V_0 en fonction de $[S]_0$ sans et avec inhibition, (b) : Linéarisation selon Lineweaver-Burck [138].

II.2.3. Réactions enzymatique à deux substrats

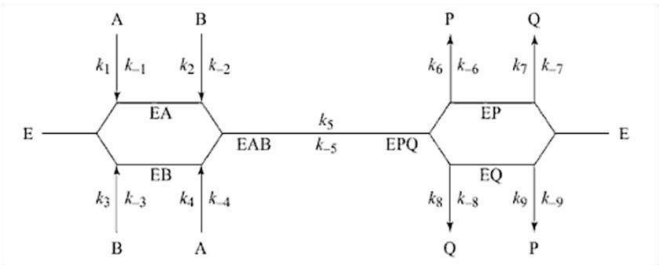
Les réactions enzymatiques qui impliquent deux substrats et qui conduisent à la formation de deux produits représentent environ 60% des réactions enzymatiques connues. Presque toutes ces réactions sont des réactions catalysées soit par des transférases, ou soit par des oxydoréductases selon la réaction suivante [133] :

$$A + B \underset{}{\overset{F}{\rightleftharpoons}} P + Q$$

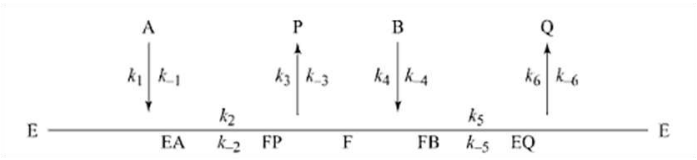
La présence de deux substrats pose le problème de leur ordre de fixation sur l'enzyme. Il en est de même pour l'ordre de libération des produits de réactions, lorsqu'il y en a plusieurs. Si les deux substrats se fixent l'un après l'autre avant que les produits de réaction ne quittent l'enzyme, on dit que la fixation est séquentielle. Si c'est toujours le même substrat que se fixe le premier, on dit que la fixation est ordonnée. Au contraire, celle-ci est aléatoire si les deux substrats peuvent se fixer dans n'importe quel ordre. Les mécanismes où un produit ou plusieurs sont libérés avant que tous les substrats aient été ajoutés sont appelés des réactions Ping-Pong. On utilise des schémas dits de Cleland (figure II-9) pour rendre plus clairs les évènements qui se déroulent [139] :



a-Mécanisme séquentiel (à complexe ternaire) ordonné



b-Mécanisme séquentiel (à complexe ternaire) aléatoire



c-Mécanisme ping-pong (à enzyme modifié)

Figure II-9 : Représentation schématique des mécanismes enzymatiques à deux substrats selon Cleland [138].

Pour en étudier la cinétique et faire la distinction entre ces différents mécanismes de réactions à deux substrats, on trace les courbes en doubles inverses ($1/V_0$=f ($1/[S]_0$). Une autre méthode plus facile permet d'étudier la cinétique des réactions à deux substrats où on se place dans des conditions artificielles. On mesure les variations de vitesse de la réaction en présence de concentrations très élevée du composé B lorsqu'on fait varier la concentration de A, puis on fait de même avec une concentration élevée, non limitante de A. Ainsi, on se ramène à une cinétique à un seul substrat. On définit une constante de Michaelis K_m^A et K_m^B pour chaque substrat [133,139].

II.3. IMMOBILISATION DES ENZYMES

II.3.1. Définition et caractéristiques de l'immobilisation

Les problèmes liés à l'inactivation de l'enzyme libre et à sa séparation du produit d'une réaction, ont amené les chercheurs à s'orienter vers l'idée de ne plus mélanger l'enzyme libre au substrat mais de faire passer le substrat sur l'enzyme fixée au préalable dans un support solide, ce qui permet de récupérer l'enzyme et de la réutiliser à nouveau ou bien de mettre en œuvre cette enzyme dans un

bioréacteur à fonctionnement continu. L'immobilisation de protéines, et en particulier d'enzymes, sur des supports solides, est à l'origine d'un grand nombre d'applications dans les domaines biomédical, environnemental et industriel. Lorsqu'elles sont utilisées en tant que biocatalyseurs, par exemple pour la production de molécules chirales (chimie, pharmacie) ou pour la transformation de produits naturels (agroalimentaire), il est indispensable, au plan économique, de prolonger la durée d'utilisation des enzymes. Leur immobilisation sur support solide permet généralement d'augmenter leur stabilité au cours du temps et procure également un moyen efficace pour les opérations de séparation / recyclage, en mode discontinu, ou de rétention dans l'espace réactionnel, pour un réacteur en fonctionnement continu. Parmi les qualités recherchées pour les matériaux constituant les supports, l'inertie chimique et le faible coût sont primordiaux [140].

II.3.2. Méthodes d'immobilisation des enzymes

Les méthodes d'immobilisations des enzymes peuvent être subdivisées selon leur fixation en deux méthodes (figure II-10) [141,142].

II.3.2.1. Méthodes irréversibles

a) **Immobilisation par liaisons covalentes :** son avantage réside essentiellement dans la solidité de la liaison enzyme-support, mais la nécessité d'activer certains supports, puis de procéder à des réactions chimiques délicates de fixation représente un inconvénient certain. L'enzyme ainsi fixée acquiert des propriétés exceptionnelles de résistance aux variations de températures, et de pH.

b) **Immobilisation par inclusion :** revient à emprisonner l'enzyme dans les mailles d'un réseau d'une matrice polymérique : gel de polyacrylamide, d'amidon, d'alginate, de carraghénanes, etc. l'enzyme fixée se présente sous forme de billes, de capsules, de membranes. C'est un procédé simple, économique, universel et valable pour toutes les enzymes mais les risques de fuite sont non négligeables si les mailles du réseau sont larges ; la cinétique enzymatique est compliquée par des phénomènes de diffusion de substrats et de produits si la réticulation est très serrée.

c) **Immobilisation par microencapsulation :** l'enzyme en solution aqueuse est enfermé dans des microcapsules sphériques, dont la paroi est une membrane semi-perméable qui peut être liquide ou solide. Cette membrane retient l'enzyme, mais laisse passer le substrat S et le produit P. Les microcapsules, dont le diamètre moyen est de 50 μm, peuvent être réalisées par polymérisation interfaciale.

d) **Immobilisation par réticulation :** en traitant un enzyme par un agent chimique hydrosoluble bi-fonctionnel et susceptible de réagir sur les groupements fonctionnels libres de celui-ci, on

obtient un réseau enzymatique tridimensionnel et insoluble. Cette méthode a l'avantage de fournir des dérivés insolubles constitués presque exclusivement d'enzymes. Malheureusement, les produits sont gélatineux et difficiles à filtrer, leurs propriétés mécaniques sont médiocres accompagné d'une perte importante d'activité enzymatique.

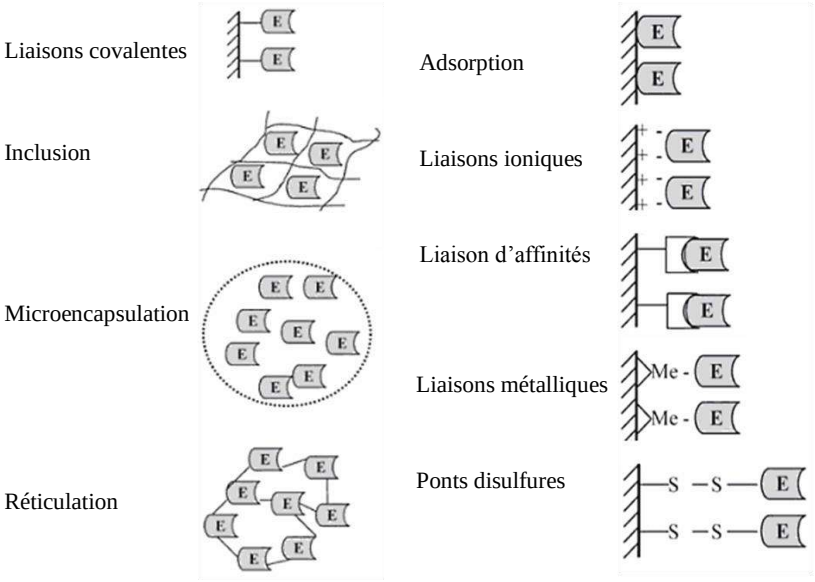


Figure II-10 : Méthodes réversibles et irréversibles d'immobilisation des enzymes [140].

II.3.2.2. Méthodes réversibles

a) **Immobilisation par adsorption:** Dans ce procédé, l'enzyme est retenue à la surface d'un corps adsorbant, minéral ou organique, grâce à des liaisons de Van der Waals et à des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles), mais les risques de désorption de l'enzyme sont importants, et la fixation ne peut être considérée comme spécifique.

b) **Immobilisation par liaisons ioniques :** S'effectue entre la protéine enzymatique et le support lipophile qui contient des résidus échangeur des ions. La fixation au support est facile mais elle cause des changements dans la conformation de l'enzyme et son site actif.

c) **Immobilisation par liaisons d'affinités :** Il existe une complémentarité entre les biomolécules de l'enzyme et le support. Cette sélectivité remarquable constitue le majeur avantage dans la méthode.

d) **Immobilisation par liaisons métalliques :** Les sels métalliques transitoires et les hydroxyles sont déposés à la surface des supports par coordination avec les groupements nucléophiles dans les matrices. Ils sont précipités sur différents supports (cellulose, chitine, alginate) par le chauffage ou par la neutralisation.

e) **Immobilisation par ponts disulfures :** Cette méthode est unique car, malgré la formation d'une liaison covalente stable entre la matrice et l'enzyme, il est possible d'avoir sa rupture par la réaction avec des agents appropriés comme le dithiothreitol (DTT) dans des conditions douces.

II.3.3. Limitations diffusionnelles

Lorsqu'un biocatalyseur, soit une enzyme ou une cellule, est immobilisée dans ou sur un support, la vitesse de réaction est souvent limitée par des transferts de matière à l'intérieur ou à l'extérieur de ce support. En effet le processus global de la transformation du substrat met en jeu plusieurs étapes : le transport du ou des substrats de la solution jusqu'au niveau du catalyseur ; la transformation des substrats en produits au niveau du catalyseur ; le transport en sens inverse du ou des produits du catalyseur jusque dans la solution (figure II-11). Si avec des enzymes solubles l'étape de la réaction est la seule limitante, par contre avec des enzymes fixées sur des supports, les étapes de transfert des substrats et des produits peuvent aussi devenir limitantes. Ceci résulte à la fois des fortes concentrations locales de biocatalyseurs et des vitesses relativement faibles de transports des différents composés dans les solides. Ainsi avec des supports suffisamment actifs on observe généralement des gradients de concentration de substrats et de produits à l'intérieur ou à l'extérieur des supports [143].

En présence de limitations diffusionnelles la concentration de substrat diminue progressivement de la solution vers l'intérieur du support. Au contraire les produits tendent à s'accumuler dans ou au voisinage du support, avec une augmentation de leur concentration de la solution vers l'intérieur. Un appauvrissement des substrats et une accumulation des produits dans le microenvironnement des enzymes peuvent évidemment en modifier les activités. La plupart du temps ces phénomènes de limitations diffusionnelles résultent en une baisse de l'activité apparente du catalyseur, et, par conséquent, en une moins bonne performance de l'ensemble du réacteur [141].

L'activité catalytique de l'enzyme immobilisée est affectée principalement par les limitations diffusionnelles interne et externe. Les propriétés biochimiques, le type de réaction et la cinétique de l'enzyme ainsi que les propriétés chimiques et mécaniques du support d'immobilisation, tous ces paramètres peuvent affecter le transfert de masse interne du substrat et du produit.

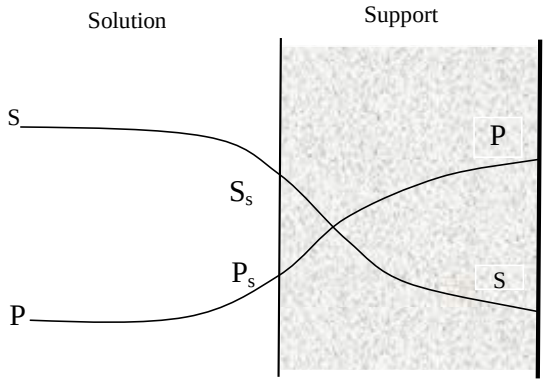


Figure II-11 : Gradients de concentration pour le substrat et le produit en présence de limitations diffusionnelles. Les enzymes sont immobilisées à l'intérieur du support poreux [141].

Le génie chimique et enzymatique a développé un ensemble de méthodes générales de calcul qui permettent de quantifier ces interférences diffusionnelles. Evidemment ces calculs supposent, en plus de la cinétique intrinsèque de la réaction enzymatique, une bonne maitrise des différentes étapes de transfert de matière. On est ainsi amené à distinguer deux étapes de transport : le transport des substances à l'extérieur des supports solides et de la diffusion à l'intérieur des milieux poreux. L'impact des contraintes diffusionnelles sur la vitesse globale de bioconversion enzymatique peut être quantifié à travers deux grandeurs [140] :

a) Le facteur d'efficacité η : définit par :

$$\boldsymbol{\eta = \frac{vitesse\ initiale\ de\ l''enzyme\ libre}{vitesse\ initiale\ de\ l'enzyme\ immobilisée}} \qquad \textbf{(II-4)}$$

b) Le module de Thiele ϕ :

$$\Phi = \frac{1}{\eta}\left(\frac{1}{\tanh 3\Phi} - \frac{1}{3\Phi}\right) \qquad \textbf{(II-5)}$$

L'estimation des paramètres adimensionnelles η et Φ, connues respectivement, comme le facteur d'efficacité et le module de Thiele, est très important, car ils relient la vitesse de réaction au taux de diffusion. La connaissance du facteur d'efficacité η est d'une importance cruciale pour l'analyse quantitative du bioprocédés en utilisant les biocatalyseurs immobilisées. Le module de Thiele, c'est la valeur qui détermine l'importance des limitations diffusionnelles et par conséquent des gradients de concentrations à l'intérieur du support. Lorsqu'elle est très faible, la diffusion du substrat n'est pas limitante et les concentrations sont particulièrement uniformes. Par contre aux fortes valeurs de Φ lorsque la quantité d'enzymes immobilisées est élevée, la diffusion interne devient limitante et on obtient des gradients de concentration de substrat prononcé dans le support [144].

II.4. BIORÉACTEURSÀ ENZYMES IMMOBILISÉES

II.4.1. Définition du bioréacteur enzymatique

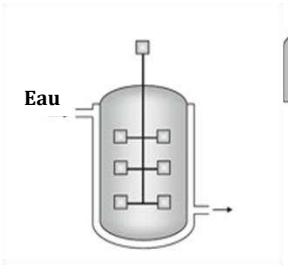
C'est le lieu de la réaction biochimique catalysée par des enzymes transformant un substrat en produit. Le bioréacteur enzymatique constitue le cœur des unités de fabrications biochimiques, rencontrées aussi bien dans les complexes de biosynthèses et actuellement dans le traitement et la biodégradation des effluents. Dans de telles unités industrielles, le réacteur est généralement entouré d'appareillages, placés en amont et en aval, permettant les traitements physiques des matières premières et des produits de la réaction. Le réacteur est ainsi conçu en fonction du type de processus qui doit s'y dérouler. La réaction enzymatique peut ainsi être produite en discontinu (batch), en alimentation continue (fed batch) ou totalement en continu (alimentation et soutirage [145].

II.4.2. Principe de choix et de dimensionnement

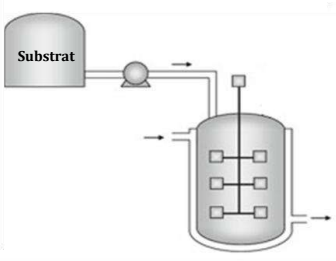
Les réactions enzymatiques sont conduites généralement dans des réacteurs dont le choix du design et de la configuration est fait en considérant plusieurs paramètres tels que le type de la réaction mise en œuvre, la nature de la molécule d'intérêt, la quantité à produire, la forme de l'enzyme utilisée(libre ou immobilisée) et son coût. Ainsi, il existe des réacteurs industriels pour la catalyse homogène (enzymes libres) quand le coût du catalyseur est suffisamment faible pour permettre son utilisation unique et pour la catalyse hétérogène (enzymes immobilisées) qui permet la récupération et la réutilisation du catalyseur quand celui-ci est au contraire coûteux [146].

II.4.3. Principales configurations des bioréacteurs enzymatiques

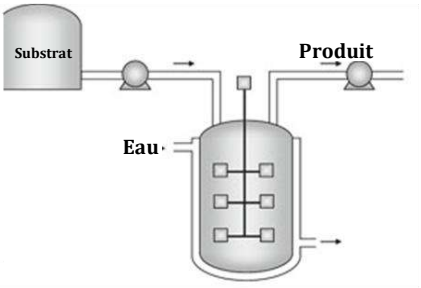
Les réacteurs peuvent être plus ou moins élaborés dans leur conception et disposer de plus ou moins de matériel annexe. La plupart des réacteurs sont cylindriques ou parallélépipédiques mais ils peuvent aussi être cylindroconiques pour permettre de travailler sur des petits volumes en conférant une meilleure récupération. Les réacteurs disposent généralement de plusieurs entrées pour permettre d'ajouter des accessoires ou pour pouvoir intervenir sur le milieu réactionnel. Par ces entrées peuvent ainsi être introduits dans le système des capteurs de mesure physique (sonde de température, électrode de pH, sonde de pression...), des sondes de distribution (liquide, gaz...), etc. La température, par exemple, est régulée soit par le biais d'une double enveloppe à circulation continue, soit par l'ajout d'un thermoplongeur directement dans le système [147].



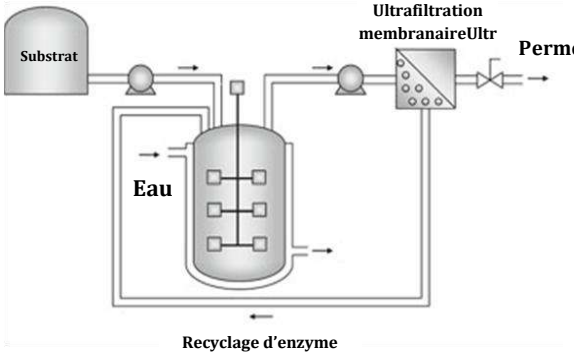
Réacteur agité discontinu



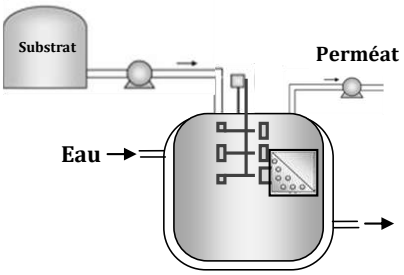
Réacteur agité semi-continu



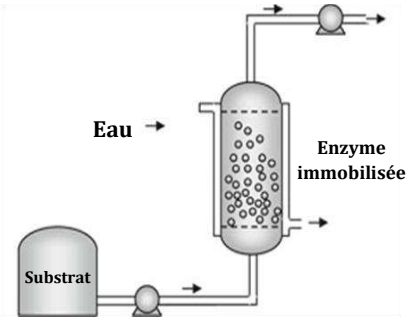
Réacteur agité continu



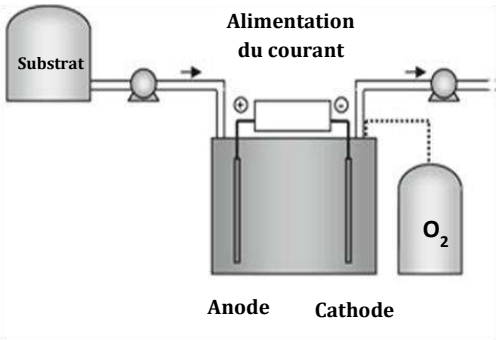
Réacteur à membrane à boucle externe



Réacteur à membrane immergée



Réacteur à lit fluidisé



Réacteur électrochimique

Figure II-12 : Principales configurations des bioréacteurs enzymatiques [147].

La réaction enzymatique est conduite dans un réacteur. Cela implique des dispositifs qui peuvent être très simples ou complexes en faisant intervenir des appareils annexes (pompe péristaltique,…). Les réacteurs enzymatiques sont utilisés de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle. Leur capacité peut ainsi varier de quelques millilitres à des centaines de mètres cubes. Une présentation générale et rapide des principaux bioréacteurs est nécessaire. Les principaux appareils utilisés pour effectuer des bioréactions sont les cuves mécaniquement agités, les réacteurs à membranes, les réacteurs électroenzymatiques, et, enfin, les réacteurs à lit fixe et fluidisé. La figure II-12 représente les configurations de ces bioréacteurs, celle du réacteur à lit fixe sera expliquée juste ultérieurement [147].

II.4.4. Bioréacteur enzymatique à lit fixe

C'est actuellement le type de réacteur le plus répandu. Une colonne est remplie d'un garnissage des particules poreuses contenant les enzymes. Le substrat à traiter circule d'une manière ascendante ou descendante, avec éventuellement un recyclage de la sortie vers l'entrée. Dans ce réacteur, les enzymes sont immobilisées sur des supports (particules ou billes) qui sont chargés dans un lit fixe (figure II-13-a). L'alimentation peut se faire de bas en haut ou de haut en bas selon le type de construction (figure II-13-b). Le réacteur à lit fixe permet à la fois d'avoir une importante productivité et un produit final exempt d'enzymes étant donné que celles-ci sont confinées dans le réacteur, évitant ainsi une étape finale de séparation du biocatalyseur et du produit [147] .

Si l'on considère l'écoulement du milieu liquide, le lit fixe présente l'avantage de se rapprocher d'un écoulement type piston, c'est-à-dire de minimiser le mélange axial dans la colonne et un gradient décroissant de concentration en substrat est observé entre l'entrée et la sortie, parallèlement à un gradient croissant en produit. Ce type de réacteur est donc particulièrement adapté dans le cas d'une inhibition par le produit. L'alimentation du lit fixe se fera de manière ascendante (le plus souvent) ou descendante, suivant les caractéristiques du support et de la solution d'alimentation [135].

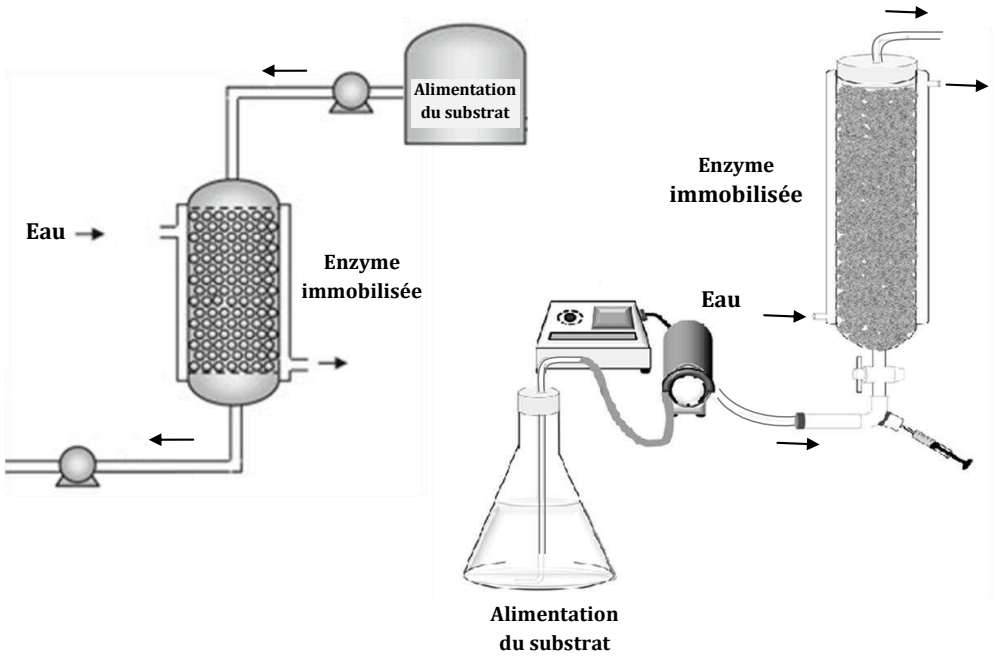


Figure II-13: Représentation de bioréacteur enzymatique à lit fixe : (a) : du haut vers le bas, (b) du bas vers le haut [147,148].

Les réacteurs à lit fixe sont utilisés pour la mise en œuvre des réactions à l'échelle industrielles principalement en raison de leur efficacité, leur faible coût et de la simplicité de leur conception. La réaction à lieu en continu ce qui permet un meilleur contrôle du procédé, une productivité plus élevé et l'obtention de produits plus homogène. En plus, avec la plupart des cinétiques enzymatiques, l'absence de rétromélange dans le lit fixe conduit, à volume de réacteur égal, à des performances supérieures à celles d'un réacteur continu bien mélangé. Les réacteurs à lit fixe constituent la configuration classique utilisée dans la conduite de réactions catalytiques hétérogènes à grande échelle et ils sont couramment utilisés dans les procédés à enzymes immobilisées, pour le traitement d'eaux et d'effluents [149]. Il est cependant important de noter que ce réacteur conduit à une forte perte de charge ainsi qu'au risque de colmatage du lit et d'importantes limitations diffusionnelles ce qui réduit ses performances. Par ailleurs, on note dans certains cas la compaction du lit ou la désactivation des enzymes [150].

II.4.5. Calcul de réacteur à lit fixe à enzymes immobilisées

Selon leurs applications les réacteurs à lit fixe à enzymes immobilisées fonctionnent en continu. Dans ce mode de fonctionnement il y a une alimentation continue des substrats et un soutirage continu des produits. La plupart du temps le volume de liquide à l'intérieur du réacteur est maintenu constant avec un débit de soutirage égal au débit d'alimentation La performance d'un réacteur continu, exprimé par le degré de conversion de substrat à la sortie du réacteur, en plus de la cinétique de la réaction mise en œuvre dépend aussi de l'hydrodynamique de la phase liquide à l'intérieur du réacteur [151].

Un élément de fluide entrant progresse régulièrement dans le réacteur sans se mélanger avec les éléments antérieurs ou postérieurs. Tous les éléments de fluide ont donc le même temps de séjour à l'intérieur de l'installation. Comme principale différence avec le réacteur mélangé, les concentrations n'y sont plus uniformes : la concentration de substrat diminue progressivement de l'entrée à la sortie, tandis que le niveau de produit augmente. Dans ces conditions la vitesse de réaction varie également selon la position dans le réacteur, et il n'est plus possible d'écrire un simple bilan substrat sur l'ensemble de l'installation. On considère dans un premier temps que l'écoulement est du type piston, ce qui permet d'écrire un bilan substrat sur un élément différentiel de réacteur de volume dV (figure II-14) [148]. D'une manière générale, Le bioréacteur est calculé à travers les bilans, en se basant sur certaines hypothèses telles que ;

- Réaction isothermique dans un réacteur à lit fixe garnie par une enzyme immobilisée dans des billes sphériques opéré avec un régime permanent.
- Réaction enzymatique d'ordre un ;
- Les particules sphériques sont distribuées uniformément dans le bioréacteur
- Ecoulement hydrodynamique du liquide est analogue à celui du réacteur piston

Le bilan établit pourra être donc représenté comme suit :

Vitesse d'entrée + vitesse de production = vitesse de sortie + vitesse de variation interne

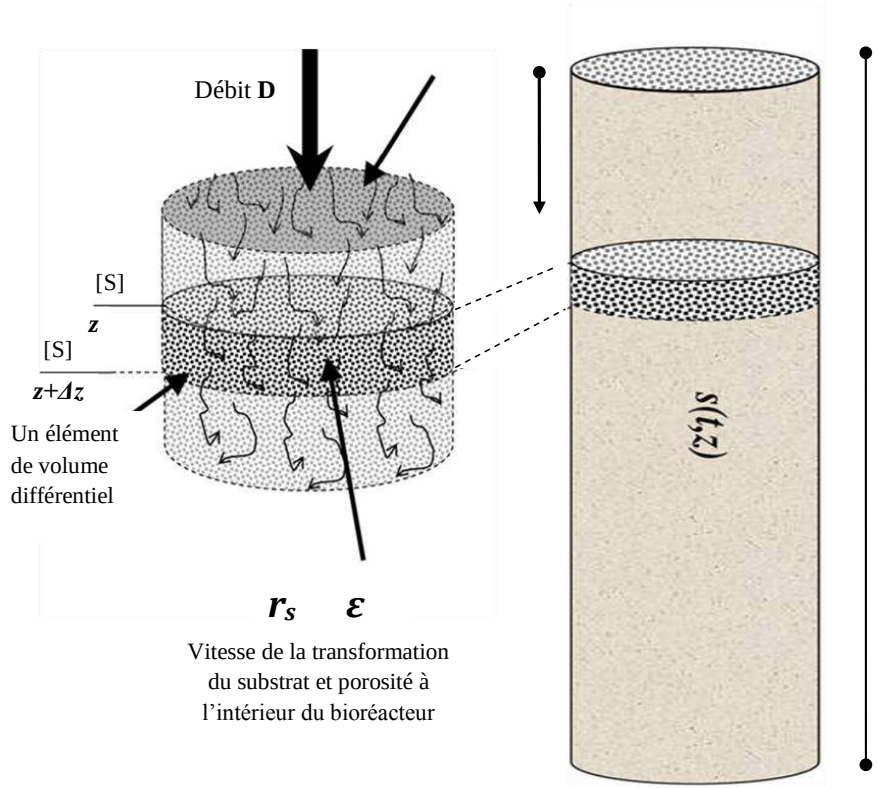


Figure II-14 : Elément de volume dV de réacteur à lit fixe considéré pour l'établissement du bilan sur le substrat [148].

Lorsque la vitesse r par unité de volume est exprimée en fonction des diverses concentrations, l'équation différentielle donne la variation de concentration dS lorsque le fluide progresse d'un volume dV dans le réacteur. Intégrée cette équation donne l'évolution de S dans le réacteur, et par la suite la concentration S à la sortie. L'objectif fixé par une modélisation d'un réacteur est de pouvoir calculer son volume total et par conséquent la détermination de son diamètre et sa hauteur qui nous permet de faire une conception d'un bioréacteur. Donc, en appliquant la formule ci-dessus on trouve :

Vitesse d'entrée – vitesse de sortie + vitesse de production =0

$$D.[S] - D([S]+d[S]) - r_s \eta dV(1-\varepsilon)=0 \quad \textbf{(II-6)}$$

Tel que :

[S] : Concentration du substrat en mg/L

D : Débit volumique de la solution aqueuse à traiter en mL/h

$\mathbf{r_s}$: Vitesse de la réaction enzymatique exprimée en mg/ (L.min)

η : Facteur d'efficacité du biocatalyseur

V: Volume du bioréacteur exprimé en mL

ε : Porosité du garnissage du bioréacteur

L'intégration de l'équation (II-6) dépend de l'ordre de la réaction enzymatique :

- Si la réaction est d'ordre 1 ayant la formule suivante :

$$\boldsymbol{v_0 = \frac{V_{max}}{K_S}[S]_0} \quad \textbf{(II-7)}$$

- Le volume du bioréacteur sera déterminé comme suit :

$$\boldsymbol{V = \frac{K_S D\, ln\frac{[S]_0}{[S]}}{V_{max}\eta(1-\varepsilon)}} \quad \textbf{(II-8)}$$

- Dans le cas d'une cinétique Michaelienne ayant la formule suivante :

$$\boldsymbol{v_0 = \frac{V_{max}[S]_0}{K_M+[S]_0}} \quad \textbf{(II-9)}$$

Le volume du bioréacteur sera déterminé comme suit :

$$\boldsymbol{V = \frac{K_M \ln\frac{[S_0]}{[S]}+[S_0]-[S]}{V_{max}\eta(1-\varepsilon)}D} \quad \textbf{(II-10)}$$

II.4.6. Traitement des colorants azoïques dans les bioréacteurs enzymatiques à peroxydase

A l'échelle industrielle, les réactions enzymatiques sont menées soit dans des réacteurs fermés où le substrat et l'enzyme sont initialement mélangés et où la réaction se déroule sans aucun apport ni soutirage, soit en réacteurs continus avec un renouvellement du mélange et une élimination du produit formé. Pour cela différentes configurations de réacteurs sont envisageables (réacteur agité, colonne garnie, lit fluidisé). Dans les paragraphes suivants, une discussion sur l'utilisation des différentes configurations de réacteur enzymatique à base de la peroxydase est présentée, mettant en œuvre sur utilisation et application de chacun d'eux dans la dégradation des composés aromatiques et plus particulièrement les colorants azoïques. Exemples dans la littérature ont résumés dans le tableau II-2 :

Les réacteurs enzymatiques agités à peroxydase libre ou immobilisé sont les plus étudiés avec les trois types de conduite : batch, fed-batch ou continue. Les réacteurs agités discontinus à base des

peroxydases de différents sources végétales (les graines de soja et le raifort noir) et les peroxydases d'origine fongique (MnP et LiP) ont été très utilisés pour l'élimination du phénol et ses dérivés [152,153,154] que pour la dégradation des colorants [155,156]. La même constatation a été marqué pour les réacteurs agités continus où l'élimination des composés phénoliques contenus dans des eaux résiduaires a été plus étudiés que les colorants et il a été effectuée en utilisant la peroxydase des grains de soja et la peroxydase de raifort [157,158].

Bien que des efforts aient été faits pour développer les réacteurs enzymatiques à membrane basé sur l'immobilisation de peroxydases sur la membrane, les configurations les plus appliqués correspondent à l'utilisation de réacteurs de contact direct pour le traitement des eaux usées, avec les MnP appliquées aux effluents contenant les colorants. Lopez et al [159] ont étudié la décoloration d'un colorant azoïque orange II par la manganèse peroxydase (MnP). La configuration est composée d'un réacteur à cuve agitée couplée à une membrane d'ultrafiltration avec différentes stratégies opérationnelles (batch, fed-batch et en continu). Une décoloration de 85% de l'orange II est trouvée pour un mode de conduite continu pendant 18 jours avec un pouvoir catalytique de 42.5 mg de l'orange II oxydé par unité enzymatique de MnP [159].

La combinaison de la catalyse enzymatique et la production électrochimique de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans un bioréacteur électroenzymatique a été étudié en immobilisant la peroxydase de raifort (HRP) pour dégrader le colorant azoïque orange II dans un réacteur à lit fixe à deux compartiments et il a été montré que l'application du procédé électroenzymatique conduit à un raux de dégradation supérieur à celui utilisé sans enzyme [160].

Les réacteurs à lit fluidisés sont aussi utilisés dans l'élimination des colorants mais dont la majorité des cas en utilisant des microorganismes immobilisés [161,162]. La décoloration du colorant azoïque rouge RBN dans un réacteur à lit fluidisé en utilisant l'alcool polyvinylecomme un support d'immobilisation des cellules bactériennes a été réalisé et différents paramètres ont été étudié comme l'expansion de lit, la densité des billes, la concentration initiale du colorant, le temps de séjour et le diamètre des billes [163].

Peu de travaux et de recherches scientifiques sont impliqués dans la dégradation des colorants azoïques dans des bioréacteurs à lit fixe garnis par la peroxydase immobilisée d'origine végétale. Mais on trouve dans l'autre côté l'utilisation de ce type de bioréacteur soit pour la dégradation des phénols(composé très étudié que les colorants) en utilisant la peroxydase végétale, bactérienne et fongique [164,165] soit pour décolorer les colorants textiles et azoïques mais avec des cellules immobilisées qui produisent la peroxydase [166,167]. Certains chercheurs ont dégradé certains

composés toxiques comme la benzidine dans un réacteur enzymatique garnie par la peroxydase extraite du courge amère et immobilisée par inclusion dans l'alginate de calcium mais à lit horizontal. Karim et al ont montré une efficacité d'élimination de la benzidine de40% après un mois du fonctionnement continu dans ce type de bioréacteur [168].

Le tableau II-2 résume quelques travaux sur l'utilisation de différentes configurations de biréacteurs avec la peroxydase :

Tableau II-2: Application des réacteurs enzymatiques pour des réactions peroxydasiques

Configuration du bioréacteur	Enzyme	Réaction	Référence
Réacteur agité discontinu	Peroxydase des graines de soja	Dégradation des phénols	[152]
	Peroxydase de raifort	Elimination des phénols	[153]
	Chloroperoxydase	Époxydation du styrène Oxydation Asymétrique Réaction d'halogénation	[169] [170] [171]
	Manganèse peroxydase	Dégradation des colorants Bioblanchiment du papier ou de la pate	[154] [172]
	Lignin peroxydase	Biodégradation du Pentachlorophénol	[173]
	Bitter gourd peroxydase	Élimination des phénols	[174]
Réacteur agité continu	Peroxydase de raifort	Élimination du phénol Décomposition du peroxyde d'hydrogène Elimination des composés aromatiques	[158] [175] [176]
	Peroxydase des graines de soja	Elimination du phénol	[157]
Réacteur piston	Peroxydase de raifort	Traitement des phénols et les amines aromatiques	[177]
Réacteur à lit fixe	Peroxydase de raifort	Elimination du phénol	[178]
Réacteur à lit fluidisé	Peroxydase des graines de soja	Elimination du phénol	[179]
	Peroxydase de raifort	Elimination du phénol et p-chlorophénol	[180]
Réacteur à membrane	Manganèse peroxydase	Elimination des colorants	[**Erreur ! Signet non défini.**]
Réacteur électrochimique	Peroxydase d'*Aspergillus oryzae*	Traitement des effluents textiles et pétrochimiques	[181,182]
	Peroxydase de raifort	Elimination de 2,4,6-trinitrotoluène Traitement des colorants azoïques	[183] [160]

Conclusion

L'utilisation de la biocatalyse pour la réduction de la pollution engendrée par les colorants azoïques est une technique très prometteuse qui fait l'objet de nombreuses recherches. Cette technique semble aussi bien adaptée à l'utilisation des peroxydases, comme pour la décoloration ou la dégradation que pour des applications extérieures. Toutefois, il apparaît qu'elle n'est industriellement rentable qu'à partir de la réalisation d'un bioréacteur, en présentant ainsi quelques travaux sur leur utilisation dans le traitement d'effluents liquides colorés.

L'ensemble des travaux antérieurs prouve que les colorants azoïques sont dégradés et traités très largement dans différents bioréacteurs microbiens. Par ailleurs, les bioréacteurs enzymatiques à peroxydase sont aussi très utilisés mais pour d'autres applications notamment la dégradation du phénol et ses dérivés que pour la décoloration, peu de travaux et de recherches scientifiques sont dirigés vers la réalisation et la conception d'un bioréacteur enzymatique à lit fixe à base de la peroxydase immobilisée pour éliminer les colorants azoïques.

Partie B : Étude expérimentale

Chapitre III. Extraction, purification et étude de la stabilité de la peroxydase

Introduction

Compte tenu de l'application industrielle de peroxydases pour la dégradation des eaux usées réelles, les économies d'activités enzymatiques doivent être considérées, que l'enzyme est généralement l'un des facteurs les plus coûteuses de ces types de processus. Pour cela une purification de cette enzyme est nécessaire afin d'en exploiter au maximum. Ce chapitre présente la première étape de la partie expérimentale qui consiste à choisir la source végétale donnant une activité peroxydasique maximale. Par la suite, une purification de l'extrait enzymatique brut sera nécessaire pour assurer la stabilité de son activité enzymatique ainsi que l'obtention d'une activité spécifique maximale. Le choix des sources végétales et en particulier les légumes est justifié pour plusieurs raisons : la disponibilité de ces derniers, la facilité de préparation de la solution enzymatique par un simple broyage et la clarté de la chair qui facilite la visualisation de la réaction colorée.

III.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

III.1.1. Réactifs utilisés

Substrat principal de la peroxydase : Peroxyde d'hydrogène (ou l'eau oxygénée H_2O_2)

- Masse molaire : 34,01 g/mol.
- Densité à 20°C : 1.11.
- Pureté : 30% p/V, 100 volumes.
- Point de fusion : 43 °C
- Point d'ébullition : 108°C

Réactifs utilisés dans le test standard de mesure de l'activité enzymatique

Tableau III-1: Propriétés physicochimiques du phénol et 4-amino-antipyrine.

Réactifs / Renseignements	Phénol (substrat)	4-aminoantipyrine (4-AAP)
Formule	C_6H_6O	$C_{11}H_{13}N_3O$
Masse molaire	94,11g/mol.	203,29 g/mol
Solubilité dans l'eau	98 g/L	55,90 mol/L
Densité à 20°C	1.073	--
Point de fusion	-33°C	--
Point d'ébullition	182 °C	--

Réactifs de purification de l'enzyme peroxydase

- *Acétone (C_3H_6O)* : C'est un solvant organique très soluble dans l'eau et présente un bon agent de purification pour précipiter les protéines. En effet, sa faible constante diélectrique abaisse le pouvoir de solvatation de ses solutions aqueuses pour des ions dissoutes comme les protéines. Les solubilités différentes des protéines dans de type de solvant sont à la base d'une technique de fractionnement intéressante. L'acétone est utilisée généralement dans la purification à des températures proches de 0°C ou inférieures, car à des températures plus élevés, les solvants organiques ont tendance de dénaturer les protéines [133].
- *Gel de Sephadex G-100 :* de la compagnie Pharmacia, est probablement la plus connue des résines de filtration sur gel. Il est constitué de dextran (un polymère linéaire de glucose) dont les fibres sont réticulées à l'épichlorohydrine pour former les microbilles poreuses. Comme le dextran est très hydrophile, ce gel est utilisé pour les séparations en milieu aqueux.

Les variétés de Sephadex ayant relativement une haute limite de résolution sont cependant très fragiles et ne supportent pas des débits ou des pressions hydrostatiques trop élevées. Le gel de Sephadex G-100 a un domaine de fractionnement compris entre 4 et 150 kDa [133].

III.1.2. Méthodes expérimentales

III.1.2.1. Choix de la source végétale de la peroxydase

Dans le présent travail, le criblage de la source de peroxydase sera mené sur une variété de sources végétales commercialement disponibles : pomme de terre (PT), pomme de terre douce (PTD), navet blanc, radis rouge, courgette, chou-fleur (CF) et ses feuilles (FCF), chou et grain de soja (GS). Une masse de 100 mg de chaque matériel végétal est broyée dans un mixeur. Cette homogénéisation se fait dans une solution de 200 mL d'eau distillée. L'homogénat ainsi obtenu est ensuite clarifié, le plus souvent par filtration à l'aide d'une gaze, pour éliminer les grosses particules peu ou mal broyées. On obtient ainsi pour chaque matériel végétal un extrait brut. Pour faire la distinction entre les différents extraits obtenus, un dosage de l'activité catalytique de chacun d'eux est réalisé selon le test standard de l'activité enzymatique (voir Annexe 1). Les étapes de broyage, de filtration et de dosage enzymatique sont représentées sur le schéma illustré dans la figure III-1 :

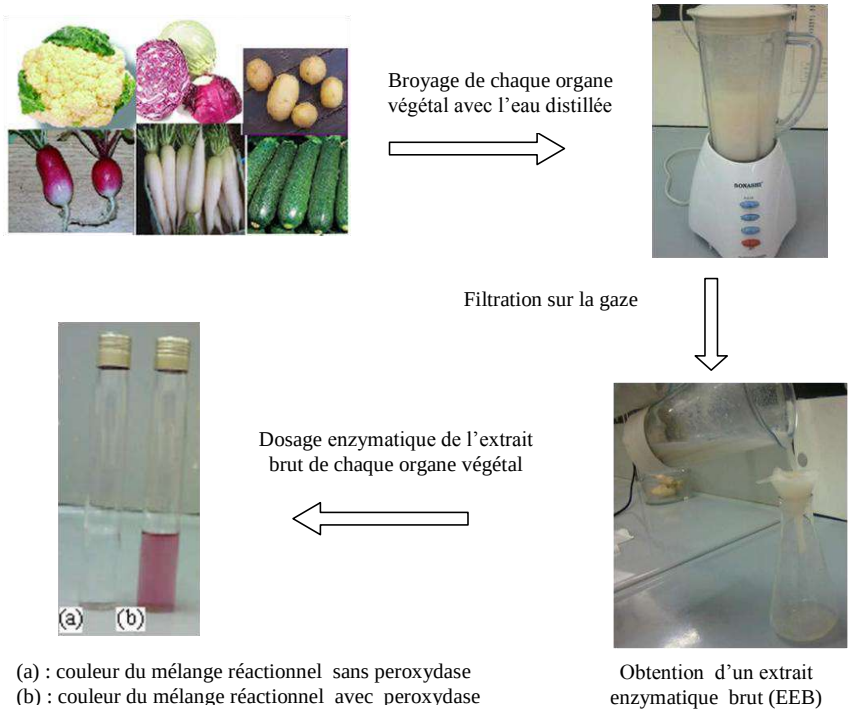


Figure III-1: Protocole de préparation et de dosage enzymatique des extraits bruts de chaque organe végétal.

III.1.2.2. Purification de la peroxydase

III.1.2.2.1. Purification par précipitation avec l'acétone

Avant d'entamer l'utilisation de la peroxydase végétale dans la dégradation des colorants azoïques, il faut tout d'abord la purifier car celle-ci doit être pratiquement exempte de contaminants si l'on veut l'utiliser d'une manière rationnelle. Il existe plusieurs techniques de purification en utilisant des agents précipitants tels que les sels et les solvants polaires. La précipitation à l'acétone glacial figure parmi les plus utilisées, vu sa simplicité dans sa mise en œuvre et son efficacité. La purification de l'extrait brut de la peroxydase est réalisée selon cette procédure décrite dans plusieurs travaux comme suit [184,185,186] :

Un volume d'acétone glacial est versé goutte à goutte dans le même volume de l'extrait brut de la source végétale possédant une activité peroxydasique élevée disposé sous agitation dans un bain de glace pilée. Une fois l'acétone est versé totalement, le mélange (extrait brut-acétone) est laissé dans le réfrigérateur à 4°C pendant 2 heures. Il se forme alors un précipité blanc. Sa récupération se fait par centrifugation à 3000 rpm pendant 10min. Le culot riche en peroxydase est dissous dans un volume minimal de tampon de composition appropriée destiné à maintenir le pH généralement aux alentours de 6,0. La solution obtenue est de l'extrait enzymatique partiellement purifiée (EEPP). La peroxydase semi purifiée est souvent stable et doit généralement être conservée dans des conditions la protégeant de la dégradation chimique et biologique. La conservation à basse température de 4^0C est de rigueur. Pour comparer entre les deux extraits (EEB et EEPP), un dosage des protéines par la méthode de Bradford et un test d'activité enzymatique (voir Annexe 1) sont fait. Les étapes de purification sont récapitulées sur la figure III-2.

III.1.2.2.2. Purification par filtration sur gel de Sephadex G-100

Comme toutes les chromatographies, la filtration sur gel peut servir comme une étape de la purification d'une protéine. Pour ce faire, il faut utiliser une résine de haute qualité permettant une résolution maximale. Les filtrations sur gel sont souvent la dernière étape d'une purification de protéines car, pour être efficaces, elles nécessitent une préparation relativement "propre" ayant un petit volume. La phase stationnaire est constituée par le gel de Sephadex G-100 qui sera coulé dans une colonne de dimensions de (25 cmx1cm). La phase mobile est constituée de l'EEPP dissout dans la solution tampon pH 6.0 et traverse la colonne avec un débit lent de 15.75 mL/h. Les solutions éluées seront récoltées par fraction de 1 mL diluées dans 2mL de la solution tampon pH 6.0. Leur activité enzymatique sera évaluée par le test standard de la peroxydase (voir annexe 1) et la quantité de protéine sera dosée à 280 nm.

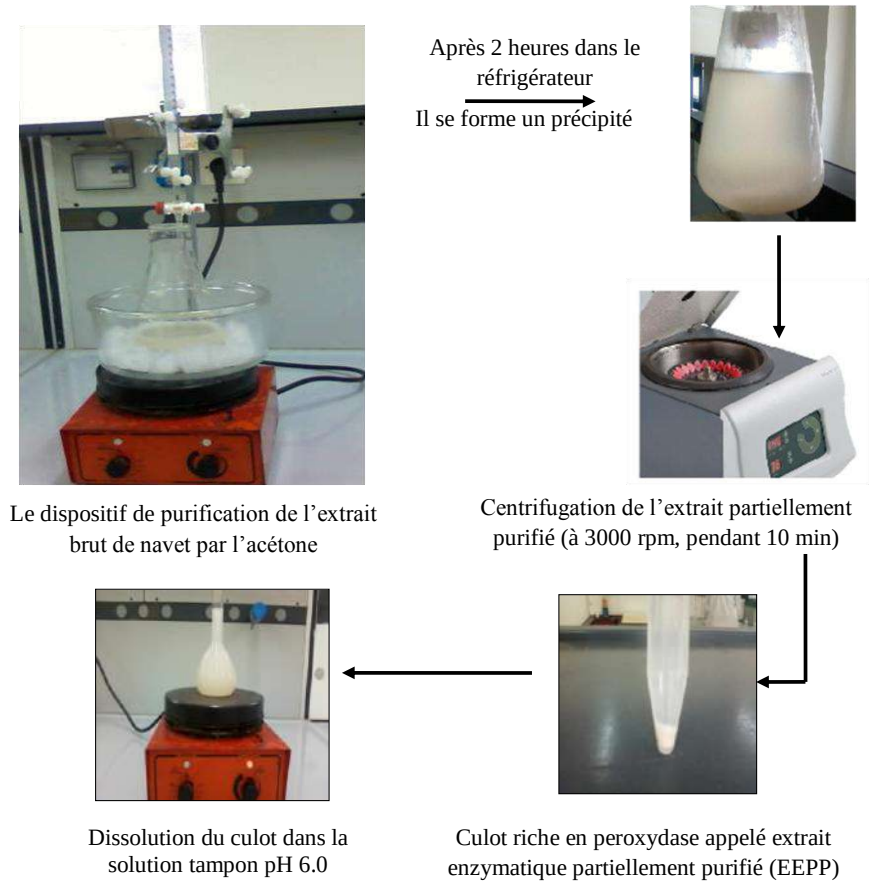


Figure III-2: Technique de purification de l'extrait brut de la peroxydase par précipitation à l'acétone.

III.1.2.3. Test de stabilité de la peroxydase

La stabilité de la peroxydase dans les deux cas, brut et purifié, a été menée en mesurant l'activité peroxydasique à des intervalles de temps réguliers pendant une durée qui dépasse trois mois.

III.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.2.1. Choix de la source végétale de la peroxydase

L'évolution de la densité optique à la longueur d'onde λ_{max}=517 nm suite au test standard est représentée en fonction du temps pour chacune des sources végétales. Les résultats sont illustrés sur la figure III-3 :

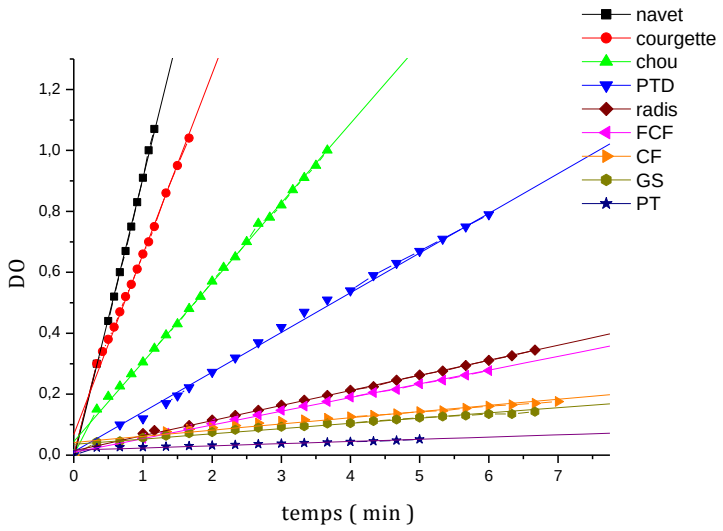


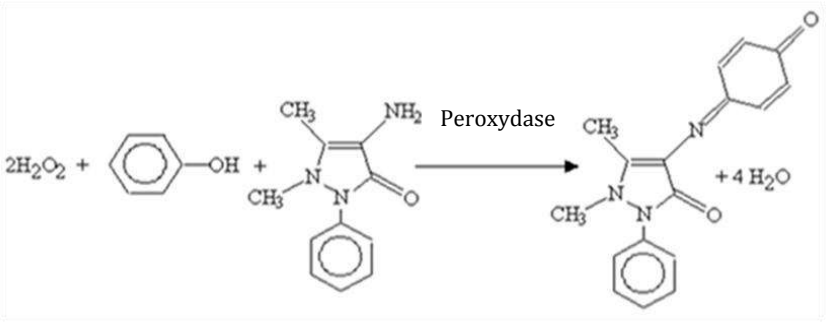
Figure III-3 : Activités enzymatiques de la peroxydase pour différentes sources végétales (λ_{max}=517nm).

Les valeurs des vitesses initiales ainsi obtenus en ΔDO/min sont converties en concentrations de substrats H_2O_2 transformé à l'aide de la courbe d'étalonnage (voir annexe 1). La courbe d'étalonnage est faite par un dosage de substrat peroxyde d'hydrogène mais pour des concentrations très dilués. Grâce à des réactions qui mettent en œuvre l'enzyme 'peroxydase', on dose le produit coloré après une transformation totale de H_2O_2. Dans ce cas, l'enzyme n'est qu'un réactif particulier utilisé pour déterminer la fonction entre l'absorbance et la concentration de H_2O_2. Le coefficient d'extinction molaire obtenu à partir de la courbe d'étalonnage par la relation de Beer-Lambert est égal à 5678 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ (voir annexe 1, figure A-1). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par les travaux menés par Bhunia et al [118]. Les activités calculées à partir des pentes de la partie linéaire des courbes des cinétiques enzymatiques dans le graphe précédent sont récapitulées dans le tableau III-2 :

Tableau III-2 : Valeurs d'activité enzymatique pour différentes sources végétales de la peroxydase.

Source de la peroxydase	Activité enzymatique (UI/mL)
Navet blanc	3,406
Courgette	2,189
Chou	0,965
Pomme de terre douce (PTD)	0,481
Radis rouge	0,181
Feuilles de chou-fleur (FCF)	0,166
Chou-fleur (CF)	0,074
Graines de soja (GS)	0,063
Pomme de terre (PT)	0,026

Ce test nous permet de quantifier la quantité de peroxydase dans les différents végétaux. La peroxydase est une enzyme de type oxydoréductase qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en présence d'un deuxième substrat de nature phénolique. Le phénol substrat pour la peroxydase permettant d'avoir une activité maximale dans les conditions normales (pH 6.0, T= 25°C). Une réaction générant un chromogène est réalisée en présence d'un autre produit (4-Aminoantipyrine) (figure III-4) permet ainsi la mise en évidence et l'estimation de l'activité peroxydasique:



Phénol 4-Aminoantipyrine Quinoneimine

Figure III-4 : Réaction enzymatique de la peroxydase avec les substrats : phénol et peroxyde d'hydrogène [187].

La plupart des plantes supérieures, essentiellement les Brassicacées (navet, radis, chou) et les cucurbitacées (courgette), produisent la peroxydase en quantité importante [117]. Le navet, du latin *Brassica rapa*, est une plante herbacée de la famille des Brassicacées. La variété locale contient donc une quantité significative de peroxydase et sera donc le choix optimal pour la suite de l'étude. De nombreux travaux ont été menés sur l'utilisation de la peroxydase pour le traitement des effluents chargés en colorants ou de composés phénoliques [188].

III.2.2. Purification de la peroxydase

La purification partielle ou totale de de la peroxydase permet son utilisation rationnelle en gardant la stabilité de son pouvoir catalytique maximal par élimination d'impuretés de nature protéique ou non-protéique. Le degré de pureté sera évalué à travers la mesure de l'activité spécifique de la peroxydase avant et après purification. Pour cela, la quantité de protéines totales présentes dans les deux extraits est dosée par la méthode de Bradford et l'activité enzymatique de la peroxydase est évaluée par le test standard (voir figure A-2 dans l'annexe1). Le tableau III-3 rassemble les résultats des tests pour l'extrait brut (EEB) et pour l'extrait purifié (EEPP).

A titre indicatif, la purification a été menée à un stade avancé grâce à la technique de filtration sur gel de Sephadex G-100. Dans cette technique de chromatographie par filtration sur gel, appelée également chromatographie par exclusion ou par tamisage moléculaire, les molécules sont séparées selon leur taille et leur forme. Les résultats obtenus ont montrées qu'on peut isoler la peroxydase des autres protéines et d'après le profil d'élution du chromatogramme illustré dans la figure III-5, il y a eu une séparation complète des deux composés, celui dont les molécules sont plus grandes étant élué en premier et elles possèdent une activité peroxydasique plus élevé comme le montre la courbe de variation de l'activité enzymatique en fonction du volume d'élution. Par conséquent, la peroxydase a été éluée entre les fractions 15 et 20, le deuxième pic représente les protéines qui ne possèdent pas l'activité peroxydasique.

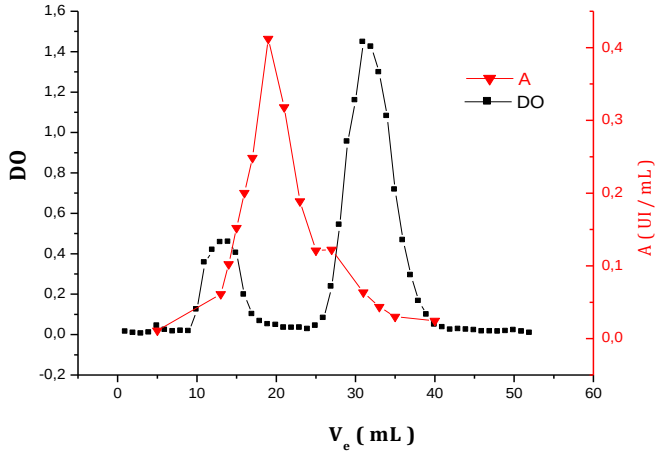


Figure III-5 : Profil d'élution de la peroxydase de navet sur une résine Sephadex G-100. (Une colonne de (25cmx1cm), Q=15.75 mL/h, le volume de fractions récoltées est 1ml, dilution dans 2mL

Tableau III-3 : Caractéristiques des solutions enzymatiques avant et après la purification

Étape	Protéine totale (mg)	Activité totale (UI)	Activité spécifique (UI/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Homogénat initial (EEB)	46.6	2.474	0.053	--	100
Purification avec l'acétone (EEPP)	17.5	1.557	0.089	1.689	63
Purification sur gel de Sephadex G-100	0.045	0.8	17.84	336.60	32

Le tableau III-3 sert à montrer l'efficacité du processus de purification en utilisant l'acétone et le gel de Sephadex. Il fait appel à des notions et à des termes précis. On exprime la pureté d'une préparation de protéines en parlant de son activité spécifique. L'activité spécifique est l'activité enzymatique par rapport à la quantité totale de protéines dans la préparation. Elle est généralement exprimée en unités enzymatiques par poids de protéines totales. Plus l'activité spécifique est élevée, plus l'enzyme est pure. Le facteur de purification est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique, cette valeur est plus élevée par rapport à la première étape, plus l'enzyme sera purifiée plus le facteur de purification sera augmenté, dans notre cas la purification de l'EEB par fractionnement avec l'acétone permet d'augmenter plus de 1.6 fois l'activité spécifique de l'EEPP et plus de trois fois si en le purifie sur le gel de Sephadex.

Le rendement de purification est la proportion, en pourcentage (%), de l'activité de l'enzyme purifiée par rapport à la concentration en protéine initiale, puisqu'il est inévitable qu'on ait des pertes de matériel, et par conséquent la perte d'activité enzymatique. Le rendement diminue de 100 % à 63 % après la purification avec l'acétone, et il décroit jusqu'à 32% en utilisant le gel de filtration Sephadex-G-100. La purification consiste donc en un "compromis" entre l'obtention d'une enzyme (protéines) pure (facteur de purification élevé) et une activité maximale (pouvoir catalytique spécifique élevé).

Plus l'enzyme sera purifiée, plus son activité catalytique sera diminuée et plus la quantité récupérée sera très faible malgré qu'on puisse l'isoler des autres composés et accroitre son facteur de purification. Pour cela, et compte tenu de l'application environnementale de cette enzyme dans le traitement des effluents colorés qui nécessitent une grande quantité de l'enzyme, il est obligatoire pour la suite de l'étude de purifier l'extrait brut de navet qu'avec l'acétone malgré que l'utilisation du gel de Sephadex G-100 nous permette d'avoir une enzyme totalement purifiée.

III.2.3. Test de stabilité de la peroxydase

Une étude comparative consiste à faire un test de stabilité de la peroxydase de navet dans les deux cas brut et purifié est réalisé chaque cinq jour pendant une durée longue par la détermination de l'activité enzymatique initiale en utilisant le même protocole de la procédure standard. Les cinétiques obtenues en fonction des jours des deux extraits sont représentées dans la figure III-6.

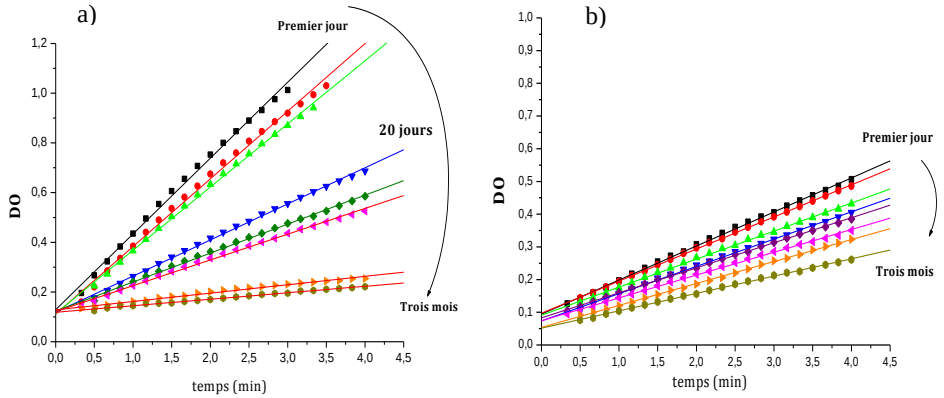


Figure III-6 : Variations de l'activité enzymatique pendant trois mois a) pour l'EEB, b) pour l'EEPP.

Les vitesses initiales sont déterminées à partir des pentes de la partie linéaire de chaque courbe et pour chaque graphe, les valeurs ainsi obtenues sont utilisées pour tracer les courbes de stabilité de l'EEB et l'EEPP, les allures sont représentées dans la figure III-7.

Une fois la peroxydase hors de son contexte naturel, elle se trouve exposée à de nombreux agents (microorganismes, agents chimiques ou physiques) qui peuvent l'endommager de manière irréversible, et par conséquent elle perd son activité enzymatique malgré le respect des conditions de conservation. La purification peut se faire dans le but d'éliminer les impuretés présentes dans l'extrait brut malgré qu'elle soit inévitablement accompagnée par une perte substantielle de l'activité ou de la quantité d'enzyme peroxydasique.

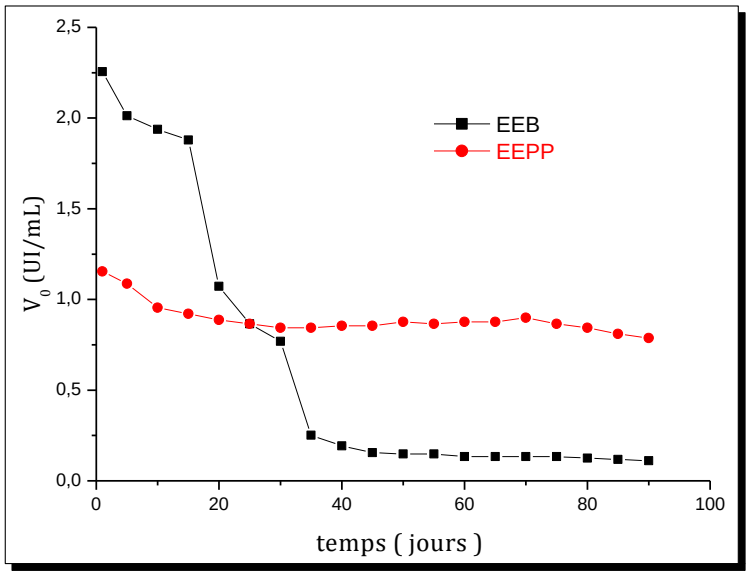


Figure III-7 : Stabilité des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP.

D'après la figure III-7 on constate que l'activité enzymatique de l'extrait brut initialement supérieure à celle de l'extrait purifié diminue dès les premiers jours. Cette diminution s'accentue à partir de la deuxième semaine. Ceci peut être expliqué par le fait que l'extrait brut présente un milieu favorable à la dégradation biologique, chimique ou photochimique provoquant ainsi la dénaturation ou la décomposition des protéines. L'activité de l'EEPP reste pratiquement stable durant deux à trois mois. Par contre pour l'extrait brut, son activité est toujours instable et décroit d'une manière très importante de 66% après un mois jusqu'à 91% après 40 jours.

Conclusion

L'utilisation d'une enzyme dans des applications industrielles et plus particulièrement pour le traitement des effluents nécessite une purification partielle afin d'obtenir une activité élevée, une spécificité convenable et une stabilité afin de garantir son utilisation rationnelle dans un procédé industriel. Cependant, l'utilisation des techniques spécifiques de purification, en général couteuses et complexes, pour la purification des enzymes destinées au traitement des effluents est déconseillée vu que cela pourra avoir un impact négatif sur le cout global de fonctionnement du procédé sans pour autant obtenir une amélioration significative du rendement de traitement.

Le pouvoir catalytique de la peroxydase dans le traitement des effluents chargés par les colorants azoïques nécessite de produire cette enzyme en grande quantité avec un cout modéré. Pour cela, la méthode de précipitation à l'acétone sera la méthode de choix pour la suite de l'étude. Il a déjà été rapporté que les peroxydases peuvent être utilisées pour la désintoxication et l'élimination de divers colorants et plus particulièrement les azoïques contenants dans les eaux polluées. La disponibilité de peroxydases les plus stables et les plus actives dans une source peu coûteuse peut être aller un long chemin vers le développement d'un système catalytique avec des applications commerciales et environnementales à large spectre. La peroxydase du navet *Brassica rapa* a été révélée être la plus stable et une enzyme plus active pour le traitement de différents polluants aromatiques.

Chapitre IV. Étude de dégradation d'un colorant azoïque rouge Congo (RC) avec la peroxydase libre et immobilisée

Introduction

Lorsque les enzymes sont utilisées en tant que biocatalyseurs pour le traitement des effluents industriels chargés par les colorants, il est indispensable, au plan économique, de prolonger la durée d'utilisation des enzymes. Leur immobilisation sur un support solide permet généralement d'augmenter leur stabilité au cours du temps et procure également un moyen efficace pour les opérations de séparation ou de rétention des produits formés suite à la transformation enzymatique, surtout pour un réacteur en fonctionnement continu. Le choix de la méthode et du support d'immobilisation est certainement un des éléments essentiels dans la conception du bioréacteur. Parmi les qualités recherchées pour les matériaux constituant les supports, l'inertie chimique, et le faible coût sont primordiaux.

Dans ce contexte, une immobilisation de la peroxydase par inclusion dans un support naturel et biodégradable appelé "alginate de sodium" permet d'assurer une bonne stabilité et réutilisation d'enzyme. Afin de concevoir un bioréacteur enzymatique dans le traitement des effluents colorés il est indispensable de réaliser des essais en système batch avec les deux formes d'enzyme libre et immobilisée dans le but de déterminer les conditions optimales qui donnent une activité et rendement maximale et déduire à la fois les constantes cinétiques de l'enzyme.

Cette partie est consacrée à l'étude de la dégradation enzymatique de la molécule modèle appartenant à la famille des colorants azoïques, le Rouge Congo (RC), par la peroxydase de navet partiellement purifiée. Les essais de dégradation sont menés en batch en suivant une stratégie expérimentale mono-factorielle, dans le but d'étudier les effets de paramètres physico-chimiques (pH, température, concentrations des substrats et de l'enzyme et présence d'effecteurs) sur le rendement et sur la vitesse de dégradation. A partir de ces résultats, les conditions optimales sous lesquelles l'efficacité maximale est réalisée seront déterminées.

IV.1. MATÉRIELS ET RÉACTIFS

IV.1.1. Le colorant azoïque rouge Congo (RC)

Le colorant azoïque RC a été découvert en 1884 par un chimiste allemand, BÖTTIGER, et il n'a guère rencontré de succès dans l'industrie car il bleuissait dans les solutions acides de l'époque, utilisées pour la coloration des textiles. L'industrie textile s'y intéressa après avoir découvert que dans une solution neutre, il colorait directement le coton, sans traitement intermédiaire ni préparatoire [189]. C'est le premier colorant découvert des azoïques directs qui a été utilisé surtout dans l'industrie textile, puisque il contient des groupes acides sulfonique qui lui confèrent une hydrosolubilité appropriée et qui permettent à la molécule du colorant de se lier ioniquement aux sites chargés du canevas polymérique du tissu [190]. Le tableau IV-1 présente les renseignements principaux du RC :

Tableau IV-1: Caractéristiques générales du rouge Congo [191,192]

Nom et formule chimique	*Dénomination*: C.I. Direct Red 28 (C.I. 22120) *Formule*: $C_{32}H_{22}N_6O_6S_2Na_2$. M=696,66 g/mol)
Propriétés chimiques	*Solubilité*: soluble dans l'eau (25 g/L) à 20°C ; éthanol ; très faiblement soluble dans l'acétone, partiellement insoluble dans l'éther, xylène.
Propriétés physiques	*Aspect*: Poudre de couleur rouge marron *Odeur*: Inodore.
Information toxicologique	Toxicité aiguë ; DL_{50} oral rat: 143 mg/kg

Le RC est une molécule diazoïque, parce qu'il possède deux chromophores azo responsable de la teinte). La tétra-azotation de la benzidine et la copulation avec l'acide naphtionique conduisent au rouge Congo, colorant très répandu dont la structure chimique est présentée dans la figure IV-1. Le rouge Congo est un colorant acide, c'est-à-dire qu'il a tendance à se fixer préférentiellement sur les structures basiques. Il est utilisé aussi en laboratoire comme un indicateur de pH, c'est pour cela qui est l'un des colorants les plus utilisés en mycologie générale et en histologie [193], son comportement dans un milieu acide est représentée dans la figure IV-2.

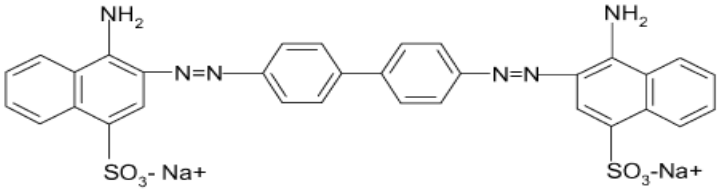


Figure IV-1 : Structure moléculaire de RC pour un pH>5.5 (couleur rouge) [194].

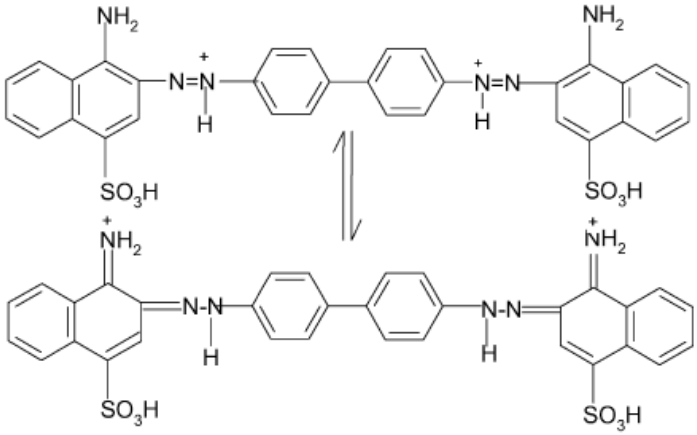


Figure IV-2 : Structure moléculaire de RC pour un pH<5.5 (couleur bleu) [194].

IV.1.2. Support d'immobilisation : Alginate de sodium

L'alginate est un polysaccharide présent chez les algues brunes ou *Phaeophyceae*, sous forme d'un mélange de sel de (sodium, potassium, calcium, magnésium) et d'acide alginique. L'acide alginique est un polymère constitué de résidus d'acides uroniques : acides α-L-guluronique et β-D-mannuronique (figure IV-3). Puisque c'est le composant squelettique des algues, il a la propriété d'être fort mais flexible [200].

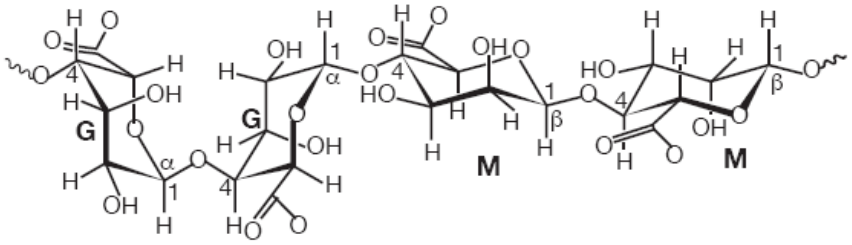


Figure IV-3 : Structure de l'alginate, G : acide guluronique. M : acide mannuronique [195].

L'alginate de sodium est une poudre blanche à brun jaunâtre pâle, lentement soluble dans l'eau en formant une solution visqueuse et colloïdale, pratiquement insoluble dans l'alcool et dans l'éther [195]. La structure ionique du gel est thermostable dans la gamme de température entre 0°C et 100°C; donc le chauffage ne liquéfiera pas le gel. A l'état solide, la forme libre du polymère se présente comme celle de la cellulose. L'alginate de sodium est principalement constitué par le sel sodique de l'acide alginique, lequel est un mélange d'acides polyuroniques $[(C_6H_8O_6)_n]$ constitués par des résidus de l'acide D-mannuronique et de l'acide L–guluronique [195].

IV.1.3. Principe de la microscopie électronique à balayage MEB

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie électronique basée sur le principe des interactions électrons-matière, capable de produire des images de la surface d'un échantillon. Fondé sur les travaux de Max Knoll et Manfred von Ardenne dans les années 1930, le principe du MEB consiste en un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface. Suite à l'excitation des atomes présents dans le matériau par interaction avec les électrons incidents, des photons X sont émis (processus de désexcitation). Le volume d'émission des photons X, de l'ordre du μm^3, dépend de l'énergie des électrons incidents, du numéro atomique moyen de l'échantillon cible et de l'énergie du niveau initialement ionisé [196].

IV.2. MÉTHODES ET ANALYSE

IV.2.1. Estimation du rendement de décoloration

Les solutions de colorant utilisé sont préparées en tenant compte de leur solubilité, le colorant azoïque utilisé dans notre étude est soluble dans l'eau. Pour tous les tests et les paramètres opératoires étudiés, nous avons utilisé la même procédure, qui consiste à préparer d'abord une solution mère de colorant de concentration donnée, qui sera utilisée pour toute l'étude. La méthode d'analyse du colorant est la spectrophotométrie UV-Visible. Un balayage du spectre d'absorption de la solution de rouge Congo (RC) dans la région UV-Visible à des longueurs d'ondes entre 400 et 700nm, réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre muni d'une cuve de 1cm de largeur, a permis de déterminer la longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption, λ_{max} = 500 nm.

Les valeurs des densités optiques ainsi obtenues seront utilisées pour calculer le rendement de décoloration du RC pour chaque paramètre étudié par la peroxydase libre et immobilisée du navet *Brassica rapa* selon la formule suivante :

$$\mathbf{R}\ (\%) = \frac{\mathbf{DO_{in} - DO_{fi}}}{\mathbf{DO_{in}}} \qquad \textbf{(IV-1)}$$

Où DO_{in} : Densité optique de la solution du colorant à l'état initiale avant le traitement enzymatique

DO_{fi} : Densité optique de la solution du colorant à l'état finale après le traitement enzymatique

IV.2.2. Effet des paramètres opératoires sur la dégradation du RC par la peroxydase libre :

Le milieu réactionnel contient 1ml de chaque substrat : le colorant à concentration indiquée dans le tableau IV-2 en mg/L et H_2O_2 en mol/L, les concentrations sont données en tenant compte du

volume de mélange réactionnel total qui est égal à 2 mL ajouté à 3mL de la solution tampon variant de pH 2.0 à pH 10.0. À température ambiante, la réaction est déclenchée par l'injection de 0.2 mL de l'extrait enzymatique purifié (EEPP) ayant une activité égale à 0.6 UI/mL. Après une heure d'incubation, les mélanges réactionnels sont centrifugés à 4000 rpm pendant 5 min pour éliminer les culots et récupérer les surnageant en les utilisant pour la lecture des valeurs des absorbances. Les paramètres à étudier sont :

- *Effet du pH* : en préparant les mélanges réactionnels dans des solutions tampons à différents pH.
- *Effet du temps de contact*
- *Effet de la température*
- *Effet de la concentration des substrats* : L'étude de la cinétique enzymatique est une étape primordiale dans la conception et de la réalisation d'un procédé enzymatique. Pour une enzyme à deux substrats, l'étude de la cinétique avec une variation des concentrations des deux substrats présente quelques complications. Pour cela on fait intervenir une méthode plus facile et simple qui consiste à fixer la concentration de l'un des substrats en le mettant en excès et on varie la concentration de l'autre substrat. Les substrats étudiés sont :
  1. *Effet de la concentration du colorant RC*
  2. *Effet de la concentration du peroxyde d'hydrogène H_2O_2*
- *Effet de la concentration de l'enzyme*

Une fois les conditions sont déterminées après étude de chaque paramètre, Le suivi au cours du temps de la décoloration sous les conditions optimales de pH, température, concentration en substrats et en enzymes, préalablement déterminées, permettra de constater qualitativement et quantitativement le résultat final du procédé enzymatique de transformation des colorants.

Tableau IV-2: Variation des niveaux des paramètres pour l'étude de la dégradation du RC par la peroxydase libre

	Conditions opératoires					
	pH V=3mL	**Temps (min)**	**T(°C)**	**[RC] (mg/L) V=1mL**	**[H_2O_2] (M) V=1mL**	**[E] (UI/mL) V=0.2mL**
pH	2-10	60	T_{a+mb}	40	0.02	0.6
Temps de contact	pH_{opt}	0-80	T_{amb}	40	0.02	0.6
Température	pH_{opt}	t_{opt}	20-80	40	0.02	0.6
[RC]	pH_{opt}	t_{opt}	T_{amb}	0-100	0.02	0.6
[H_2O_2]	pH_{opt}	t_{opt}	T_{amb}	$[RC]_{opt}$	0.005-2	0.6
[E]	pH_{opt}	t_{opt}	T_{amb}	$[RC]_{opt}$	$[H_2O_2]_{opt}$	0.03-1.5

Pour confirmer vraiment que la décoloration du colorant azoïque RC est due seulement par voie enzymatique non pas par voie chimique ou physique (effet des solutions tampons, de peroxyde d'hydrogène et de la centrifugation) on fait donc en parallèle une expérience qu'avec la solution tampon et les substrats sans enzyme, appelée «témoin».

IV.2.3. Effet des effecteurs chimiques :

Quelques produits chimiques tels que : l'acétone, l'acide ascorbique et le chlorure de calcium sont testés pour faire apparaitre leurs effets sur l'activité enzymatique de la peroxydase. On procède de la même manière et dans les mêmes conditions optimales réalisées précédemment, en ajoutant 1mL d'une solution concentrée connue de l'effecteur.

IV.2.4. Immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de calcium

IV.2.4.1. Préparation des billes d'alginates et optimisation des conditions d'immobilisation

Vu et compte tenu les phénomènes complexes liés à l'immobilisation des enzymes, une optimisation des paramètres liés au support et à l'enzyme permettant d'atteindre un meilleur taux de rétention de l'enzyme et l'obtention d'une meilleure activité catalytique est nécessaire afin de réduire au maximum la fuite de l'enzyme et les limitations difusionnelles qui diminuent l'activité enzymatique. Les conditions d'immobilisation à optimiser sont :

- La concentration du support d'immobilisation : alginate de sodium
- La concentration de chlorure de calcium qui assure la gélification
- La concentration d'enzyme

La préparation de l'enzyme immobilisée consiste à dissoudre une masse d'alginate de sodium dans 10mL de la solution de l'EEPP et on laisse le mélange sous agitation jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Après un repos de 30 min dont le but d'élimination des bulles d'air qui peuvent causer la flottation des billes à la surface de la solution de $CaCl_2$, on prépare les billes en faisant verser le mélange peroxydase / alginate, goutte à goutte à l'aide d'une seringue, dans 50mL de la solution de $CaCl_2$ mise sous agitation. Pour avoir des billes bien rigides on laisse les billes sous agitation dans la solution de chlorure de calcium pendant deux heures. Les billes seront rincés avec 25mL de l'eau distillée et les conserver à 4°C dans une solution tampon pH 6,0 (figure IV-4).

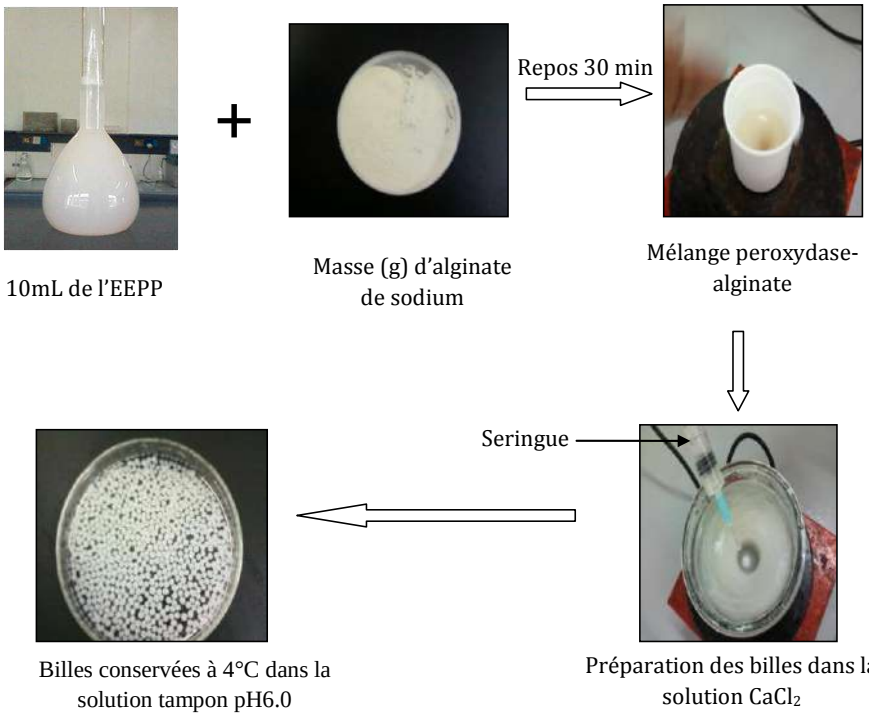


Figure IV-4 : Étapes d'immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de calcium.

Une fois les billes d'alginates de calcium seront préparées, on fait un test standard (voir annexe1) de l'activité enzymatique de la peroxydase libre, de la peroxydase immobilisée et de la peroxydase retenue dans la solution de filtrat (la solution de $CaCl_2$ et la solution de rinçage des billes) pour une variation de la concentration du support alginate de sodium entre 1-2.5% (p/V). Ce test nous permet d'estimer le rapport adéquat à lequel l'efficacité d'immobilisation (EI) et l'activité enzymatique de la peroxydase immobilisée soient maximales. Une fois la masse d'alginate de sodium mis initialement est déterminée, on refait les mêmes étapes d'immobilisation mais cette fois pour une variation de la concentration de la solution de $CaCl_2$ entre 0,05 à 0,2M. Le paramètre qui reste à optimiser est la concentration d'enzyme mis initialement entre 0.7 à 1.8 UI/mL. Le protocole d'immobilisation de l'enzyme dans l'alginate de calcium est schématisé sur la figure IV-4.

Pour la suite de l'étude, la peroxydase immobilisée dans l'alginate de calcium qui sera utilisé pour la décoloration du colorant azoïque RC sera préparée dans les conditions optimales de l'immobilisation (concentration du support, $CaCl_2$ et d'enzyme).

IV.2.4.2. Analyse par MEB des billes d'alginates

Des images de la surface des billes d'alginates ainsi obtenus sans et avec enzyme seront visualisées par La microscopie électronique à balayage (MEB) afin de pouvoir savoir comment la peroxydase se distribue sur la surface des billes d'alginates.

IV.2.4.3. Effet des paramètres opératoires sur la dégradation du RC par la peroxydase immobilisée

Dans les conditions optimales donnant une décoloration maximale du RC déterminées lors de l'étude avec l'enzyme libre, et avec la même procédure, des réactions enzymatiques sont effectués avec 0,7 g de la peroxydase immobilisée dans l'alginate de calcium afin de comparer son activité avec la peroxydase en solution.

Tableau IV-3 : Conditions opératoires pour chaque paramètre étudié avec la peroxydase immobilisée

	Conditions opératoires					
	pH V=3mL	**Temps (min)**	**T(°C)**	**[RC] (mg/L) V=1mL**	**[H_2O_2] (M) V=1mL**	**Masse des Billes d'Enzymes (g)**
pH	2-10	60	T_{amb}	50	0.05	0.7
Temps de contact	pH_{opt}	0-120	T_{amb}	50	0.05	0.7
Température	pH_{opt}	t_{opt}	20-70	50	0.05	0.7
[colorant]	pH_{opt}	t_{opt}	T_{amb}	0-200	0.05	0.7
[H_2O_2]	pH_{opt}	t_{opt}	T_{amb}	$[RC]_{opt}$	0.01-1	0.7

IV.2.4.4. Cinétique de décoloration dans les conditions optimales

Cette étape est primordiale, car il faudra toujours suivre à nouveau la cinétique de dégradation du RC dans les conditions optimales déterminées lors de l'étude de transformation enzymatique par la peroxydase immobilisée, donc à température ambiante, à pH acide 2,0 et avec une quantité de 0,7 g des billes d'alginate l'avancement de la réaction est suivi au cours du temps.

IV.2.4.5. Traitement du colorant par la peroxydase immobilisée en batch successif

L'objectif est d'analyser la stabilité de l'enzyme après plusieurs utilisations successives en estimant le rendement de décoloration à chaque fois pour une durée fixe de traitement sous les conditions optimales. Les billes d'alginates utilisées pour le premier batch seront rincées et réutilisées pour le batch suivant. La masse de billes utilisée est de 1g par 10 mL de la solution colorée.

IV.3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les valeurs des absorbances ainsi obtenues seront utilisées pour calculer le rendement de décoloration du RC pour chaque paramètre étudié et pour chaque forme de peroxydase libre ou immobilisée selon l'équation (IV-1).

IV.3.1. Effet des conditions opératoires sur la dégradation du RC par la peroxydase libre :

IV.3.1.1. Effet du pH

La plupart des enzymes ne sont actives, en fait, que pour une zone de pH étroite et il existe un pH optimale à respecter pour chaque enzyme d'où l'intérêt des milieux tampons**.** Les rendements de décoloration ainsi calculés sont représentés sur la figure IV-5. L'histogramme montre clairement que la reconnaissance peroxydase-colorant-peroxyde d'hydrogène et l'activité catalytique qui s'ensuit sont très dépendantes du pH. D'après cet histogramme on constate que l'augmentation de pH provoque une diminution de rendement de décoloration bien que l'étude ait été faite dans les trois zones de pH (acide, neutre et basique), donc le pH acide était favorable pour la dégradation du RC où l'activité enzymatique est au maximum à pH= 2,0. Ces résultats corroborent les travaux menés par Ulson de souza et al, où ils ont trouvé que le pH acide est le milieu adéquat pour traiter le Remazol Turquoise Blue G 133% et Lanaset Blue 2R [115]. La même constatation a été marquée par Maddhinni et al quand il a étudié le colorant azoïque jaune direct 12 [124].

Lorsque le pH a augmenté de 2 à 5, le rendement de décoloration du RC a diminué de 37 %, alors que pour un pH neutre le rendement a diminué de 85 %. Le rendement de décoloration de RC est supérieur à pH acide et basique par rapport au pH neutres, donc on peut dire qu'il existe toujours une ionisation soit au niveau du biocatalyseur peroxydase, soit au niveau des substrats. L'ionisation de l'enzyme peroxydase se fait en provoquant des modifications du degré d'ionisation de certains groupements fonctionnels dont la charge, positive ou négative, est nécessaire, soit à la formation et à la transformation du complexe enzyme-substrat (il s'agit alors de groupements appartenant à des aminoacides du site actif, soit au maintien de la conformation tridimensionnelle native de la peroxydase).

Par ailleurs, l'ionisation des substrats (colorant et/ou H_2O_2) se fait en changeant leur degré d'ionisation, ce qui peut permettre la formation du complexe enzyme-substrat, en d'autres termes le substrat réel de la peroxydase n'est présent que dans un intervalle de pH convenable qui est dans notre cas à pH acide [197]. Comme le substrat RC est ionisé à pH inférieur à 5,0 ; il est probable que sa structure chimique dans un milieu acide favorise la formation de complexe enzyme-substrat d'où l'augmentation de l'activité enzymatique de la peroxydase, et par conséquent l'accroissement du rendement de biodégradation du RC.

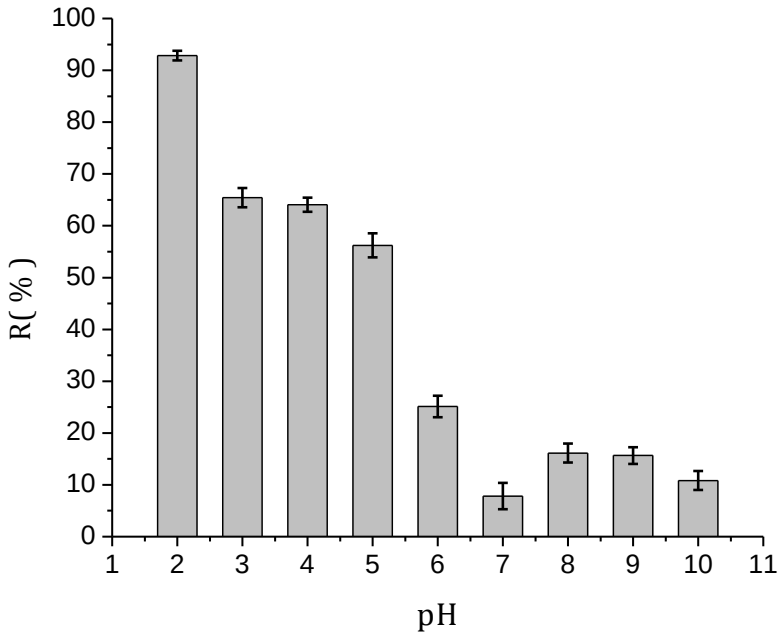


Figure IV-5 : Effet du pH sur le rendement de décoloration du RC par la peroxydase libre (t=1h ; T_{amb} ; [RC]=40mg/L ; $[H_2O_2]$=0.02M ; [E]=0.6 UI/mL).

Donc la variation du pH a entrainé des conséquences sur l'enzyme en provoquant des modifications de l'état d'ionisation de certains acides aminés situés sur le site actif ou sur la zone permettant le maintien de la conformation tridimensionnelle native de l'enzyme peroxydase. Le substrat colorant peut aussi subir une modification de son degré d'ionisation, pouvant permettre ou empêcher la formation du complexe enzyme/substrat.

IV.3.1.2. Effet du temps de contact

Une fois le pH optimale est déterminé, une autre simplification a des conséquences avantageuses. Puisque les enzymes accélèrent la vitesse des réactions immédiatement après avoir les mélangées avec leurs substrats, il serait intéressant d'effectuer une cinétique de dégradation du colorant azoïque RC par la peroxydase de navet "*Brassica rapa*". Comme la suite de l'étude et les analyses seront effectués à pH optimale déterminé (pH 2.0), il est nécessaire d'établir une courbe d'étalonnage à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption du RC (voir Annexe 2). Les courbes [RC]=f(t) et R=f(t) ainsi obtenues sont représentées sur la figure IV-6 :

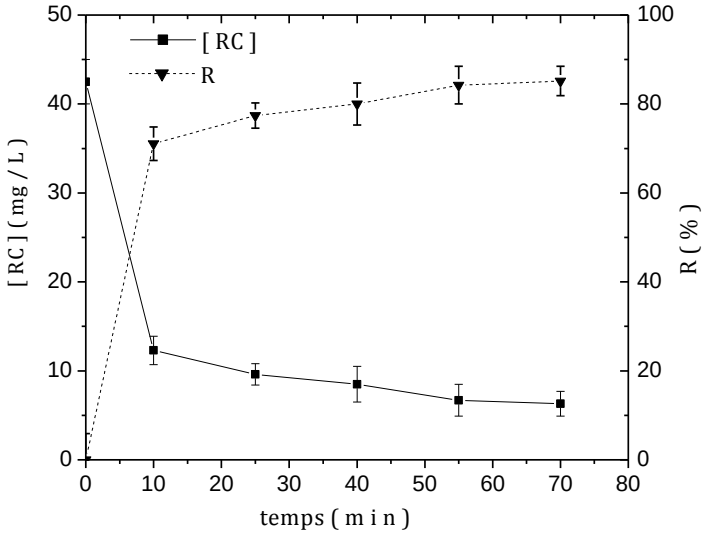


Figure IV-6: Cinétique et rendement de décoloration du RC, (pH=2.0 ; T_{amb} ; [RC]=40 mg /L ; $[H_2O_2]$=0,02M ; [E]=0,6UI/mL).

La cinétique enzymatique est suivie en mesurant la disparition du colorant au cours du temps, on voit sur la figure IV-6 que la courbe qui représente la concentration du RC en fonction du temps comporte deux phases : la première phase représente une allure quasi rectiligne, où la droite continue passant par le point de départ au temps zéro montre la vraie tangente initiale d'où la vitesse initiale. Cette partie correspond au fait que toutes les molécules de la peroxydase présentes agissent sur les molécules de substrats, très abondantes en début de réaction. Lors de la deuxième phase, il y a de moins en moins de molécules de substrats à transformer ce qui se traduit par une diminution de la vitesse de décoloration.

Inversement, le rendement de décoloration du RC augmente rapidement durant les premières dix minutes puis il tend vers une valeur constante de 86% au cours du temps. Pour la suite de l'étude il serait intéressant de préciser le temps exact à partir duquel on calcule la vitesse initiale. D'après cette expérience le temps de déroulement de la réaction enzymatique sera minimisé d'une heure jusqu'à 10 minutes.

IV.3.1.3. Effet de la température

Les rendements de décoloration du colorant azoïque RC par la peroxydase libre ainsi calculés pour chaque variation de la température sont représentés sur la figure IV-7 où il fait apparaitre deux phases

bien distinctes qui correspondent à deux phénomènes différents: *Phase de stabilité thermique de la peroxydase* : Cette phase représente la zone des températures les plus basses entre 20^0C et 40^0C, le rendement de décoloration du RC augmente quand la température augmente. Cette augmentation s'explique tout simplement par l'élévation de la concentration de complexe ES activé lorsqu'on fournit plus d'énergie sous forme thermique. Le rendement de décoloration reconnaît une valeur maximale de l'ordre de 72% est obtenu pour une température de **40°C**. La température optimale résulte d'un compromis entre l'augmentation d'activité accompagnant l'élévation de la température et la dénaturation ou l'inactivation de la protéine enzymatique par la chaleur. Dans cette zone, on peut dire que la peroxydase est stable thermiquement, car le rendement de décoloration augmente légèrement pour une augmentation de la température de 20°C à la température optimale 40°C. Des résultats analogues à celles-ci sont obtenus pour d'autres colorants traités par voies enzymatiques en utilisant la peroxydase [198].

La deuxième *phase de l'instabilité thermique de la* peroxydase : suite à l'augmentation de la température au-dessus de 40°C, on constate une chute de l'activité enzymatique et une diminution de rendement de décoloration. L'élévation de la température à partir de 40°C a pour incidence d'inactiver l'enzyme ou de dénaturer la protéine. D'autre part, une élévation de température peut provoquer la décomposition du peroxyde d'hydrogène, substrat principal dans le procédé enzymatique.

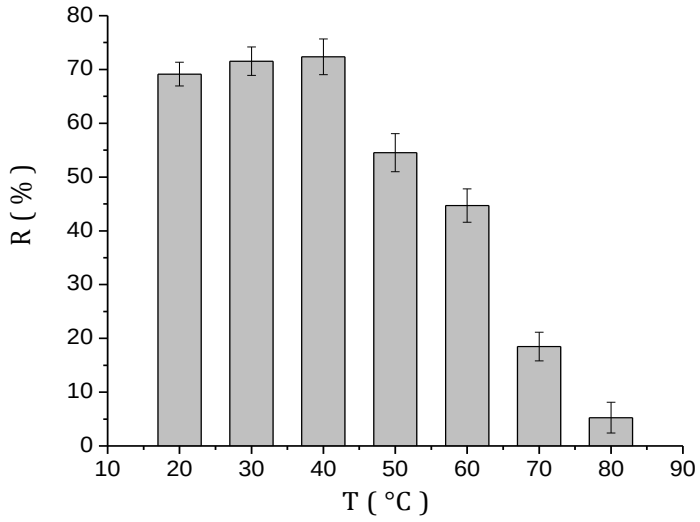


Figure IV-7: Effet de la température sur le rendement de décoloration du RC par la peroxydase libre (pH = 2,0 ; t=10min ; [RC]=40mg/L ; $[H_2O_2]$=0.02 M ; [E]=0.6UI/mL).

Plusieurs auteurs ont aussi enregistré des pourcentages analogues pour des températures dans des gammes semblables entre 35-40°C. Nous pouvons dire que, pour la suite de l'étude il est important de travailler dans la plage de température où l'activité enzymatique et le rendement sont stables sans consommer trop d'énergie, la température ambiante et la plus adéquate pour étudier l'effet des autres paramètres opératoires.

IV.3.1.4. Effet de la concentration du colorant

L'étude de la cinétique enzymatique est une étape primordiale dans la conception et de la réalisation d'un procédé enzymatique. Pour une enzyme à deux substrats, l'étude de la cinétique avec une variation des concentrations des deux substrats présente quelques complications. Pour cela on fait intervenir une méthode plus facile et simple qui consiste à fixer la concentration de l'un des substrats en le mettant en excès et on varie la concentration de l'autre substrat. Les courbes de variation de la vitesse initiale et de rendement de décoloration en fonction de la concentration en colorant sont représentées sur la figure IV-8.

La courbe v_0= f ($[RC]_0$) a une allure parabolique. À faible concentration en colorant, la vitesse initiale est bien proportionnelle à la concentration de ce substrat, comme attendue pour une réaction enzymatique d'ordre un jusqu'à ce qu'elle atteint une valeur optimale de 4.09 mg/(L.min) pour une concentration de 50 mg/L du RC. Aux fortes concentrations en RC, la vitesse de la réaction décroît progressivement. Il y a une inhibition par excès de ce substrat. Cette inhibition peut recevoir des explications différentes selon le système étudié. Dans certains cas, le substrat à forte concentration peut se loger dans le site actif avec une orientation anormale, interdisant à la réaction de se produire. L'effet correspond à une sorte d'inhibition compétitive du substrat avec lui-même. Dans d'autres cas, le substrat en excès peut réagir avec des zones de la protéine en dehors du site, provoquant des désordres réversibles ou irréversibles [199].

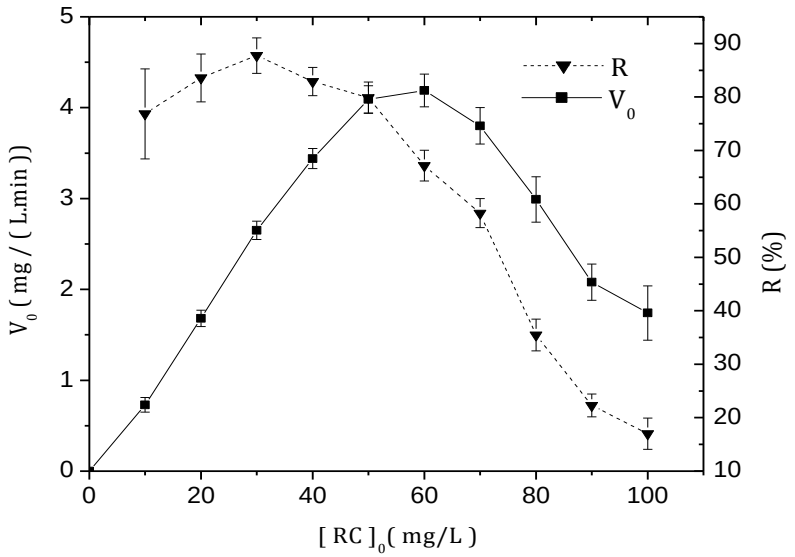


Figure IV-8: Vitesse et rendement de transformation du RC par la peroxydase libre (pH=2,0 ; t=10min ; T_{amb} ; $[H_2O_2]$=0.02 M ; [E]=0.6UI/mL).

Selon Chaplin et Palmer, l'inhibition par excès de substrat représente un cas particulier d'inhibition incompétitive. À des concentrations élevées de substrat, plusieurs molécules de substrat se fixent sur le site actif et souvent différentes parties des molécules de substrat sont fixées sur différents sous-sites du site de fixation du substrat comme l'indique la figure IV-9 [200,201].



Mode de fixation de substrat sur son site actif

Fixation plus d'un substrat sur un seul site actif

Figure IV-9: Inhibition par excès de substrat [202].

La courbe de rendement de décoloration R=f ($[RC]_0$) pourra être décomposée en deux parties essentielles: dans la première partie, le rendement augmente avec la concentration du colorant mais cette partie est limitée par rapport à la deuxième partie où le rendement de décoloration diminue

à partir d'une concentration de 30 mg/L en RC.L'intersection des deux courbes de vitesse et de rendement de décoloration donne la valeur optimale de la concentration en colorant qui est 50 mg/L et qui sera fixé pour la suite de l'étude.

Modélisation de la cinétique de transformation enzymatique du RC

Cette étape consiste à établir une relation entre la vitesse de transformation enzymatique du colorant et sa concentration qui n'est plus michaelienne et adopte à un phénomène d'inhibition par le substrat. Les modèles enzymatiques appliquées doivent refléter d'une manière adéquate les données expérimentales et permettent, par ailleurs, de déterminer des paramètres cinétiques ayant une signification physique telle que v_{max}, k_{cat}, K_s. Pour cela, plusieurs modèles ont été proposés pour la description de la cinétique enzymatique. On pourra citer par exemple : Le modèle d'Haldane (1968), le modèle d'Aiba et al. (1968) et le modèle de Teissier (1970).

Malheureusement, aucun de ces modèles n'a pu donner satisfaction, soit à cause des résultats qui présentent un écart importante par rapport aux données expérimentales, soit à cause de l'obtention de paramètres cinétiques n'ayant aucune signification physique (valeur négative par exemple). Afin de résoudre ce problème, il nous a apparu justicieux de proposer un modèle combinatoire présentant les deux parties de la courbe $V_0 = f([RC]_0)$:

- La première partie ascendante qui a une allure linéaire (cinétique enzymatique d'ordre 1) sera représentée par l'équation :

$$\boldsymbol{v_{01} = \frac{V_{max}}{K_s}[RC]_0} \qquad \textbf{(IV-2)}$$

- La deuxième partie descendante exponentiellement avec la concentration sera représentée par l'équation :

$$\boldsymbol{v_{02} = Kexp\left(\frac{-K_{si}}{[RC]_0}\right)} \qquad \textbf{(IV-3)}$$

Où K_s : constante de vitesse, K_{si} : constante d'inhibition et K : constante empirique.

Pour des concentrations faibles en RC inférieures à 60 mg/L v_{02} doit être négligeable devant v_{01}, la vitesse globale sera donc :

$$\boldsymbol{v_0 = v_{01} - v_{02} = \frac{V_{max}}{K_s}[RC]_0 - Kexp\left(\frac{-K_{si}}{[RC]_0}\right)} \qquad \textbf{(IV-4)}$$

En traçant la courbe $v_0 = f([RC]_0)$ pour $[RC]_0 < 60$ mg/l, on obtient une droite de pente $\frac{v_{max}}{K_s}$ (figure IV-10).

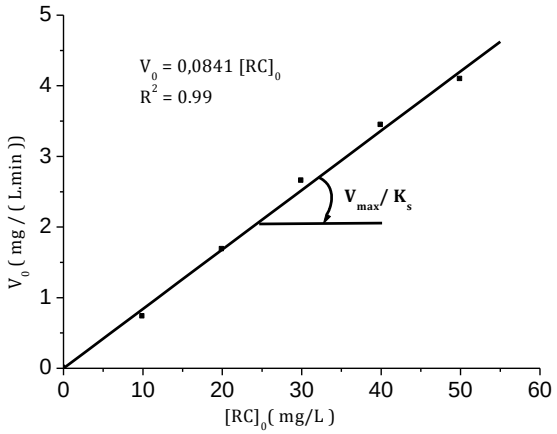


Figure IV-10: Linéarisation de la vitesse en fonction de la concentration du colorant pour des valeurs en RC entre 0-50 mg/L

En établissant le logarithme népérien dans l'équation (IV-4) on aura donc :

$$\boldsymbol{ln\left[\frac{V_{max}}{K_s}[RC]_0 - v_0\right] = ln\left[K\, exp\left(\frac{-K_{si}}{[RC]_0}\right)\right]} \quad \textbf{(IV-5)}$$

D'où :

$$\boldsymbol{ln\left[\frac{V_{max}}{K_s}[RC]_0 - v_0\right] = lnK - \frac{K_{si}}{[RC]_0}} \quad \textbf{(IV-6)}$$

par conséquent en traçant $ln\left[\frac{V_{max}}{K_s}.[RC]_0 - v_0\right]$ en fonction de $\left(\frac{1}{[RC]_0}\right)$ pour $[RC]_0$>50 mg/L, on aura une droite comme l'indique la figure IV-11**.** On obtient à la fin la constante d'inhibition K_{si} et le constante empirique K.

Après l'injection de ces constantes dans l'équation (IV-4) on obtient l'équation suivante qui décrit la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration du RC:

$$\boldsymbol{v_0 = 0.0841.[RC]_0 + 110.70.exp\left(\frac{-275.04}{[RC]_0}\right)} \quad \textbf{(IV-7)}$$

Les constantes cinétiques ainsi obtenus sont représentés dans le tableau IV-4. D'après les courbes illustrées dans figure IV-12 qui représentent les valeurs expérimentales et celles calculées d'après l'équation (IV-4), le modèle proposé reflète d'une manière adéquate les données expérimentales, l'écart varie entre 0.2% et 8%.

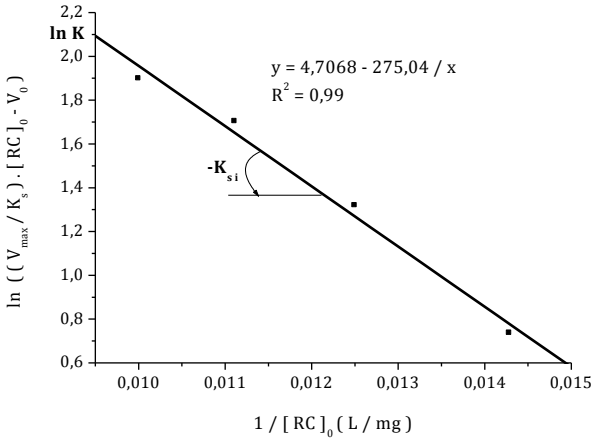


Figure IV-11: Variation des données expérimentales de la 2eme partie de la courbe de vitesse en fonction de la concentration en RC selon l'équation (IV-6)

La valeur de la constante de dissociation K_s^{col} reportée dans le tableau IV-4 permet de savoir quel est le degré d'adaptation de l'activité de la peroxydase (K_{aff}^{col}) quand cette valeur est élevée, cela signifie que la fixation du substrat sur l'enzyme est importante.

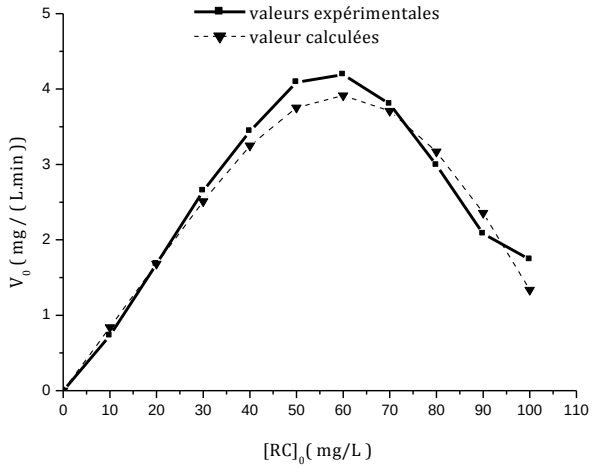


Figure IV-12 : Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de RC (comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées selon le modèle proposé)

Tableau IV-4 : Constantes cinétiques déterminées pour le RC

Constantes cinétiques	Valeurs
V_{max} (mg/(L.min))	5.50 ± 0.03
$\mathbf{K_s^{col}}$ (mg/L)	65.80 ± 0.04
$\mathbf{K_{aff}^{col}}$ (M^{-1})	10583.50 ± 6.44
$\mathbf{K_{si}^{col}}$ (mg/L)	275.00 ± 2.25
$[RC]_{opt}$(mg/L)	50
R (%)	80

IV.3.1.5. Effet de la concentration du peroxyde d'hydrogène

D'après la courbe v_0=f ($[H_2O_2]_0$) illustrée dans la figure IV-13, on constate une augmentation rapide de la vitesse initiale si la concentration en peroxyde d'hydrogène augmente, mais quand sa concentration dépasse 0.05M, la vitesse initiale devient pratiquement indépendant de la concentration de H_2O_2 et tend vers une valeur limite maximale v_{max}. Dans ce cas la valeur de la vitesse initiale reste stable pour un intervalle important de concentration en peroxyde d'hydrogène. Ce comportement est similaire à celui d'une cinétique classique de Michaelis-Menten dont on pourra déterminer les paramètres v_{max} et $K_m^{H_2O_2}$à l'aide de la représentation graphique en double inverse $\frac{1}{V_0} = f(\frac{1}{[H_2O_2]_0})$de Lineweaver-Burk.

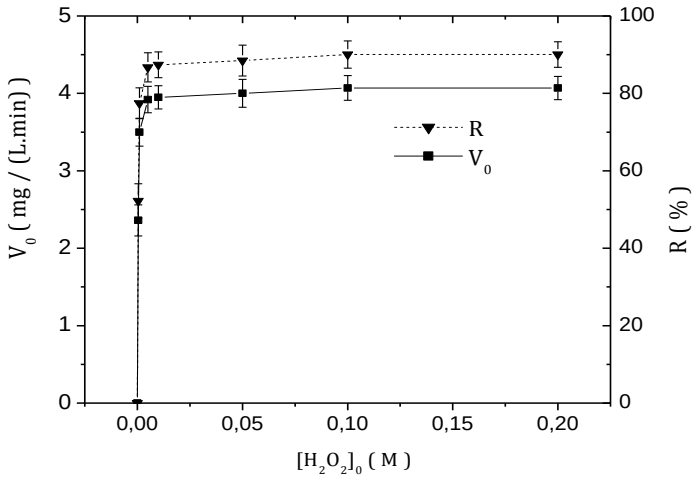


Figure IV-13: Variation de la vitesse initiale et du rendement de décoloration en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène (pH = 2,0 ; t=10min ; T_{amb} ; [RC]=50mg/L ; [E]=0.6UI/mL).

Les résultats relatifs à l'influence du peroxyde d'hydrogène sur le rendement de décoloration sont similaires à celle de la vitesse. Un rendement maximal de 90 % obtenu pour une concentration en H_2O_2 supérieure à 0.05M. Alors, le résultat optimal est obtenu pour un milieu réactionnel contenant une concentration de peroxyde d'hydrogène de 0.05 M qui sera choisi pour étudier les autres paramètres et pour la suite des expériences. L'optimisation de la concentration de substrat peroxyde d'hydrogène a permis d'augmenter le rendement de décoloration de RC de plus de 10%.

La linéarisation de Lineweaver-Burk nous permet de confirmer si la cinétique est michaelienne ou non et d'accéder aux paramètres v_{max} et $K_m^{H_2O_2}$. Les résultats sont représentés sur la figure IV-14 :

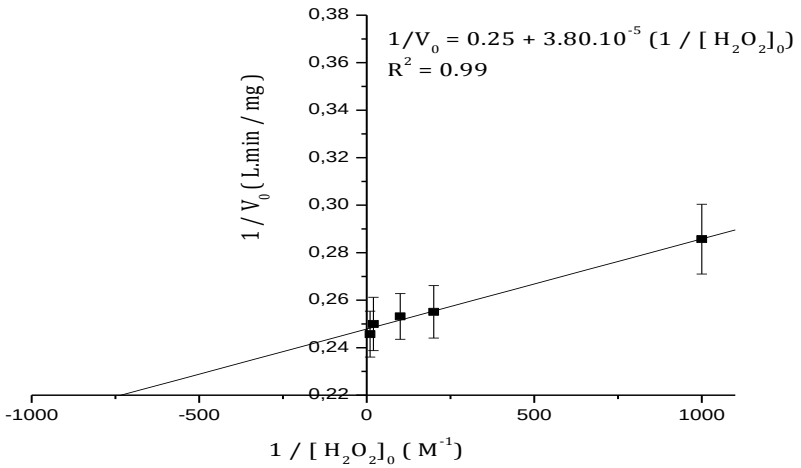


Figure IV-14: Représentation en double inverse de Lineweaver-Burk pour le substrat H_2O_2.

Les valeurs des constantes cinétiques ainsi obtenues sont introduites dans le tableau IV-5. D'après ces résultats et comparativement aux résultats de tableau IV-4, la peroxydase possède une affinité plus grande vis-à-vis du RC que pour le peroxyde d'hydrogène.

Tableau IV-5 : Constantes cinétiques déterminées pour une variation du substrat H_2O_2.

Constantes cinétiques	**Valeurs**
$\mathbf{V_{max}}$ (mg/(L.min))	4,347 ± 0.015
$\mathbf{K_m^{H_2O_2}}$ (µM)	140,4 ± 0.049
$\mathbf{K_{aff}^{H_2O_2}}$ (M^{-1})	7120 ± 2.49
$[H_2O_2]_{opt}$(M)	0,05
R (%)	90

IV.3.1.6. Effet de la concentration d'enzyme

La variation de la concentration d'enzyme conduit à l'augmentation de la vitesse de la réaction d'une manière quasi-linéaire. Ce résultat est évident puisque la disponibilité de sites enzymatiques induit l'attraction avec les molécules de substrat et par la suite le nombre de molécules converties par unité de temps sera élevé. Au-delà d'une certaine concentration en enzyme de 0.45 UI/mL, la vitesse initiale tend vers une valeur constante malgré que la concentration en enzyme augmente (figure IV-15) c'est à dire que les molécules de peroxydase sont en excès par rapport à celles de substrats. Le même constat est tiré pour le rendement de décoloration. L'optimisation de la concentration de la peroxydase a permis d'augmenter le rendement de décoloration du RC de plus de 3 % par rapport à la dernière partie.

La pente de la première partie de la courbe $v_0 = f([E]_0)$ qui est linéaire nous permet de calculer le coefficient catalytique $k_{cat,}$ cette valeur est également appelée le "*turnover number*" définit par le nombre de molécules de substrats converties en produit par unité de temps par une seule molécule d'enzyme à saturation. La constante catalytique $k_{cat,}$ qui décrit quantitativement l'influence de la concentration d'enzyme sur l'activité enzymatique de la peroxydase a été trouvé $0{,}458.10^{-3}$ µmol/s/unité enzymatique. L'effet de ce paramètre nous a permis d'atteindre un rendement de 93% pour une concentration d'enzyme maximale de 0.45UI/mL.

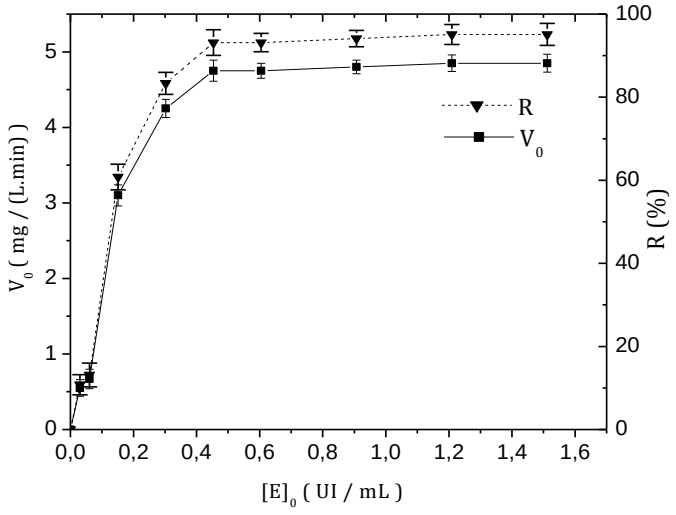


Figure IV-15: Variation de la vitesse initiale et le rendement de décoloration en fonction de la concentration en enzyme (pH = 2,0 ; t=10min ; T_{amb} ; [RC]=50mg/L ; $[H_2O_2]$=0.05 M).

IV.3.1.7. Cinétique de décoloration dans les conditions optimales

Le suivi au cours du temps de la décoloration dans les conditions optimales de pH, température, concentration en substrats et en enzymes, préalablement déterminées, permettra de constater qualitativement et quantitativement le résultat final du procédé enzymatique sur la transformation du colorant. Si l'on porte sur le même graphique la concentration du colorant disparu et le rendement de décoloration en fonction du temps dans les conditions optimales, on constate que les allures sont analogues à celles de la partie de l'influence du temps de contact faite auparavant. Cependant, la durée de traitement nécessaire pour l'obtention de l'équilibre a été réduite jusqu'à 16 minutes au lieu d'une heure. On observe sur la figure IV-16 que le rendement de dégradation atteint une valeur de 90% au bout de 2 minutes et la couleur est achevée complètement après 16 minutes.

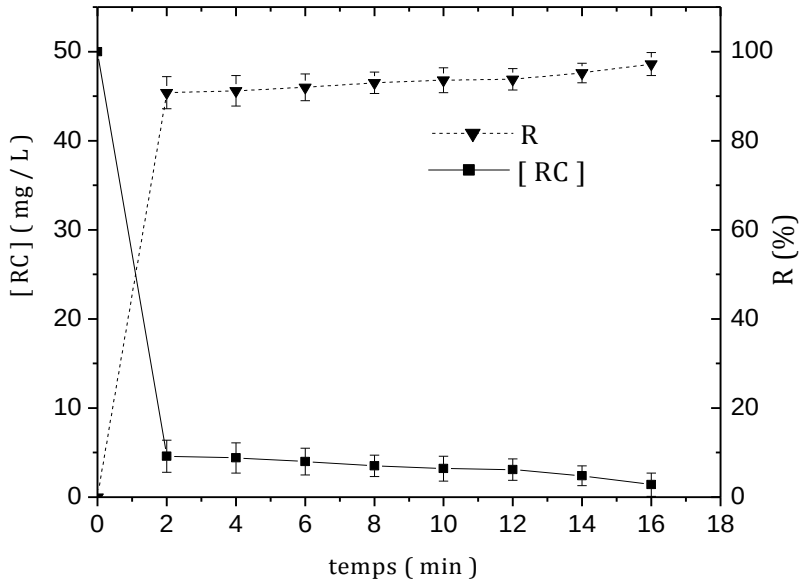


Figure IV-16: Cinétique et rendement de décoloration du RC dans les conditions optimales (pH 2.0, T_{amb}, [RC]=50mg/L, [H_2O_2]=0.05M, [E]=0.45UI/mL).

Ces résultats peuvent être a priori comparés à ceux obtenus dans d'autres travaux et notamment par différents procédés physicochimiques et enzymatiques dans le but de dégrader le même colorant étudié RC. Il est clair que le procédé enzymatique démontre encore une fois ces avantages du point de vu cinétique et technico-économique. Les différentes méthodes de décoloration du RC accompagnées avec leurs résultats et références sont regroupées dans le tableau IV-6:

Tableau IV-6: Différentes méthodes utilisées pour le traitement du RC avec leurs résultats obtenus.

Type de Processus	Résultats	Référence
Enzymatique : MnP *de Phanerochaete*	R= 100%, t= 6h.	[203]
Adsorption sur chitosan	R= 90%, t= 8h.	[204]
Enzymatique : MnP de *Schizophyllum*	R=90%, t=54h.	[205]
Photocatalytique	R=86%, t=3h.	[206]

IV.3.1.8. Effet des effecteurs chimiques :

La perturbation systématique d'une réaction enzymatique que ce soit par un activateur ou par un inhibiteur pouvant exister dans l'effluent, est un outil fondamental qui doit être pris en compte. Il est nécessaire de mieux comprendre le fonctionnement de tout système par l'observation des effets résultant de la perturbation. De même, l'étude de l'inhibition ou de l'activation enzymatique peut significativement contribuer à la compréhension des propriétés de l'enzyme peroxydase de navet "*Brassica rapa"*. Le tableau IV-7représente les taux d'inhibition et d'activation des composés qui donnent un effet de perturbation sur l'activité enzymatique de la peroxydase. Les taux d'activation $\tau_a$et d'inhibition $\tau_i$sont calculés respectivement par les formules IV-8 et IV-9 :

$$\boldsymbol{\tau_a}(\%) = \frac{\mathbf{V_0\ avec\ activateur} - \mathbf{V_0\ sans\ activateur}}{\mathbf{V_0\ avec\ activateur}} . \mathbf{100} \qquad \textbf{(IV-8)}$$

$$\boldsymbol{\tau_i}(\%) = \frac{\mathbf{V_0\ sans\ inhibiteur} - \mathbf{V_0\ avec\ inhibiteur}}{\mathbf{V_0\ sans\ inhibiteur}} . \mathbf{100} \qquad \textbf{(IV-9)}$$

Tableau IV-7: Valeurs de taux d'activations et d'inhibitions de dégradation du RC pour différents composés chimiques.

Effecteurs	Taux d'activation et d'inhibition (%)
Activateur :	
-[$CaCl_2$]=5mM	$\tau_a = 74.12$
Inhibiteurs :	
-[D-Glucose]=20 mM	$\tau_i = 38.76$
- [$C_6H_8O_6$] = 20 mM	$\tau_i = 19.27$

D'après les résultats reportés dans le tableau IV-7, et par comparaison entre l'activité enzymatique avec et sans l'effecteur, on constate que ce dernier influence sur la vitesse initiale de la peroxydase de navet. Le chlorure de calcium joue un rôle d'activateur. Une élévation importante d'activité enzymatique supérieure à 74 % a été signalée. Ceci, est dû en fait que ce composé contient un ion

(Ca^{2+}) puisque les cations métalliques divalents ou monovalents agissent comme des activateurs chez presque tous les enzymes. Les ions activateurs et l'enzyme se lient en complexes de chélation.

Par ailleurs, l'acide ascorbique et le D-glucose provoque respectivement une inhibition partielle de 19% et de 38% de l'activité enzymatique. Ce résultat montre que la structure moléculaire du colorant est le principal paramètre dans les interactions avec les effecteurs. Ceci, parce que ces substances contiennent une structure cyclique ou des fonctions similaires à celle de substrat colorant et peroxyde d'hydrogène qui peuvent entrer soit en compétition avec le site actif de substrat, soit avec le complexe ES en inactivant la peroxydase ou soit avec les deux en mêmes temps.

IV.3.2. Optimisation des paramètres d'immobilisation de la peroxydase

L'alginate est l'un des polymères le plus fréquemment utilisé pour l'immobilisation par inclusion non seulement grâce à ses propriétés de gélification mais aussi grâce à sa non-toxicité, sa biodégradabilité, simplicité de mise en œuvre et le coût. La gélification qui est l'une des principales propriétés des alginates est due au fait qu'ils réagissent avec les cations divalents, dans notre cas il s'agit d'une substitution des cations de sodium par les cations de calcium selon la réaction suivante:

$$2\ (C_5H_7O_4COO^-, Na^+) + Ca^{2+} \longrightarrow (2\ C_5H_7O_4COO^-, Ca^{2+}) + 2Na^+$$

La fixation de la peroxydase se fait dans les mailles de gel d'alginate de calcium où l'enzyme est ajouté avant la polymérisation du gel. Cette technique d'immobilisation par inclusion est généralement la plus stable où l'enzyme est emprisonnée à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une matrice. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme et permet la diffusion du substrat. Les billes ainsi obtenues, sont sphériques, rigides et stables chimiquement et mécaniquement. Elles sont d'un diamètre moyen de 2.486 mm et une masse moyenne de 0.008 g.

Les billes d'alginates ont également fait l'objet d'observation au microscopie électronique à balayage (MEB). Ainsi, il peut être observé sur la figure IV-17 la distribution de la peroxydase sur la couche externe de la bille d'alginate ou l'enzyme apparait sous forme des points blancs multiples. Cela peut être confirmé après l'agrandissement de l'image 160 fois où l'apparence de l'enzyme est claire dans la bille contenue la peroxydase illustré sur la figure IV-18 en comparant avec celle de la bille vide.

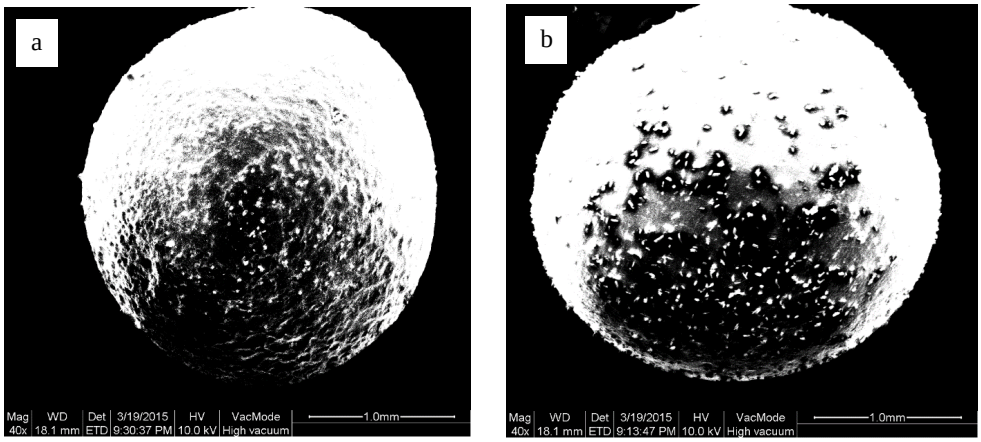
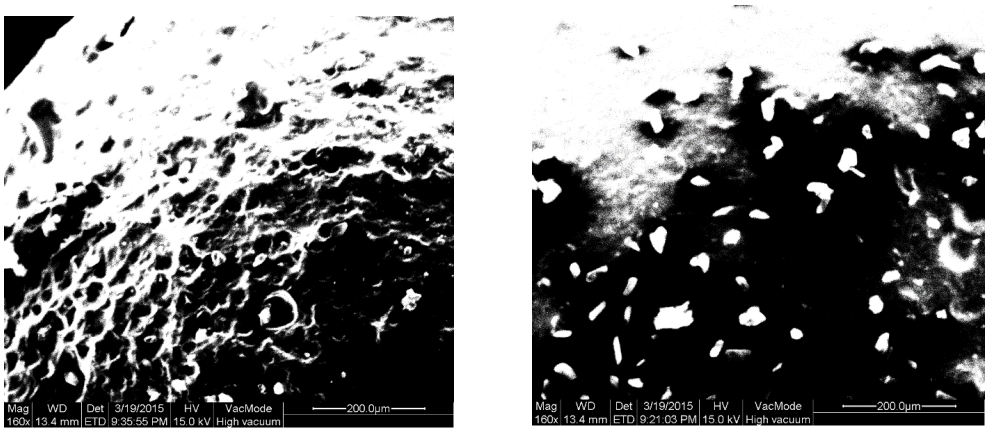


Figure IV-17 : Observation de la couche externe des billes d'alginate de calcium par MEB a) sans enzyme, b) avec enzyme (image zoomée 40 fois).



a b

Figure IV-18 : Observation de la couche externe des billes d'alginate de calcium par MEB a) sans enzyme, b) avec enzyme (image zoomée 160 fois)

L'ensemble des substrats (phénol et peroxyde d'hydrogène) étant initialement incolores subit le traitement enzymatique après addition de la peroxydase sous forme immobilisée. On constate le gonflement des billes et l'apparition d'une couleur rose, mais d'une manière lente par rapport la peroxydase libre. Cette couleur apparaît d'abord dans les billes puis diffuse lentement dans le milieu, ce qui implique que le déroulement de la réaction se fait à l'intérieur des billes par la pénétration des substrats et puis la libération du produit dans le milieu réactionnel. Les phénomènes de pénétration et de libération sont des phénomènes de diffusion où il y a un transfert de masse. La figure IV-19 représente les billes de la peroxydase immobilisée par inclusion dans l'alginate de calcium avant et après la réaction.

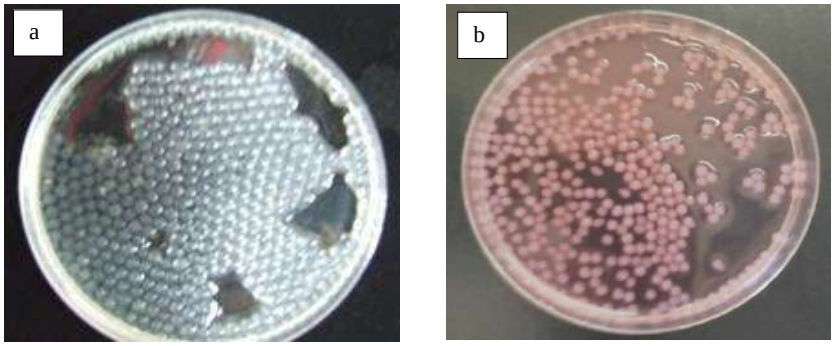


Figure IV-19 : Billes de peroxydase immobilisée, a) avant la réaction, b) après la réaction

Vu les phénomènes diffusionnelles complexes liés à l'immobilisation des enzymes est dans le but d'atteindre un meilleur taux de rétention de l'enzyme (minimum de fuite) et une activité maximale de l'enzyme immobilisée, des tests ont été mené dans les conditions physicochimiques standards en faisant varier trois paramètres principaux :

- La concentration du support d'immobilisation alginate de sodium
- La concentration en agent de chélation ($CaCl_2$).
- La concentration d'enzyme à immobiliser

Les paramètres pouvant être mesurés (réponses) sont :

- ***Efficacité de l'immobilisation : ou taux de rétention***

  Calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{EI}\ (\%) = \frac{[\mathbf{E}]_{\mathbf{l}}.\mathbf{V_{EL}} - [\mathbf{E}]_{\mathbf{f}}.\mathbf{V_f}}{[\mathbf{E}]_{\mathbf{l}}.\mathbf{V_{EL}}}.\mathbf{100} \qquad \textbf{(IV-10)}$$

  $[E]_l$: Concentration de l'enzyme libre exprimée en UI/mL
  $[E]_f$: Concentration de l'enzyme du filtrat (solution de $CaCl_2$ et de rinçage) (UI/mL)
  V_{EL} : Volume de l'enzyme libre (mL)
  V_f : Volume de l'enzyme du filtrat (mL)

- ***Activité retenue ou facteur d'efficacité η :*** Les phénomènes de diffusion influencent sur l'activité enzymatique de la peroxydase immobilisée. Pour les quantifier, on calcule le facteur d'efficacité η ou l'activité retenue, donc, pour une certaine quantité de billes on mesure la vitesse initiale de l'enzyme immobilisée (v_{0Eim}), pour la même quantité d'enzyme, cette vitesse sera comparée à celle de l'enzyme libre (v_{oEL}) par la formule suivante :

$$\boldsymbol{\eta}(\%) = \frac{\mathbf{v_{0Eim}}}{\mathbf{v_{0EL}}}.\mathbf{100} \qquad \textbf{(IV-11)}$$

En appliquant les équations IV-10 et IV-11, des paramètres d'immobilisation tel que : l'efficacité d'immobilisation (taux de rétention) et le facteur d'efficacité pouvant être calculés pour une variation de la concentration massique (p/V) du support d'AG-Na exprimé en %, de la charge en enzyme à immobiliser et la concentration de chlorure de calcium. Les résultats obtenus sont introduites dans le tableau IV-8.

Le tableau IV-8 montre clairement que l'efficacité d'immobilisation augmente avec la concentration du support, donc avec la masse d'alginate. Plus ce gel est présent en grande quantité, plus le mélange (alginate de sodium/peroxydase) devient visqueux, plus les billes deviennent plus rigides qui permettent une bonne rétention de l'enzyme et réduisent la fuite de la peroxydase vers le milieu extérieur (solution de gélification $CaCl_2$, solution de rinçage et de conservation des billes). Le facteur d'efficacité est en optimum pour une concentration d'AG-Na de 1,5%. Au-delà de cette valeur on distingue deux cas : pour des valeurs de concentrations d'AG-Na inférieures à 1.5%, l'efficacité d'immobilisation et le facteur d'efficacité sont respectivement de l'ordre de 71.94% et de 26.27% pour une concentration massique de 1% d'AG-Na, cela peut être expliqué que les billes d'alginates sont moins rigides, donc une fuite importante de l'enzyme dans le milieu extérieur et par conséquent une mauvaise rétention d'enzyme.

Tableau IV-8: Efficacité d'immobilisation et facteur d'efficacité calculés à différents concentrations en support, enzyme et $CaCl_2$.

Essai n°1	Concentration d'alginate de sodium (% P/V) ; [$CaCl_2$]= 0.1M ;[E] = 0.7 UI/ml			
	1	1.5	2	2.5
EI (%)	71.94	76.59	76.01	83.32
η (%)	26.27	45.73	37.96	32.00
Essai n°2	Concentration d'enzyme à immobiliser (UI/mL) ; [AG-Na]= 1.5% ; [$CaCl_2$]= 0.05M			
	0.7	1.0	1.3	1.8
EI (%	77.82	60.08	63.45	54.00
η (%)	13.98	30.10	40.82	41.94
Essai n°3	Concentration de chlorure de calcium (M) ;[AG-Na]= 1.5% ; [E] =1.3 UI/ml			
	0.05	0.1	0.15	0.2
EI (%)	52.30	35.78	50.01	46.23
η (%)	30.86	28.39	27.90	27.40

Par ailleurs, pour des concentrations du support supérieures à 1.5%, les billes sont plus rigides, donc une bonne rétention d'enzyme qui augmente jusqu'à 83% pour 2.5% d'AG-Na, mais on trouve en revanche pour la même valeur que la diffusion de substrat à l'intérieur des billes et de produit à l'extérieur est très lente et le transfert de masse devient limitant ce qui entraine la diminution de

l'activité enzymatique à 30% par rapport à la valeur maximale. Ces deux phénomènes conduisent à la réduction de l'activité enzymatique, et par conséquent la diminution de facteur d'efficacité. Donc, une concentration massique d'AG-Na de 1.5% sera fixée pour la suite de l'étude pour l'optimisation des conditions d'immobilisation de la peroxydase et de décoloration du RC.

La charge en enzyme joue un rôle très important dans l'immobilisation de n'importe quelle enzyme, dans notre cas l'augmentation de la concentration d'enzyme à immobiliser engendre une meilleure rétention d'enzyme mais elle provoque un abaissement de l'activité enzymatique due à l'encombrement stérique des molécules d'enzyme dans les mailles du support ce qui réduit la formation du complexe enzyme-substrat. Les valeurs de l'essai n°2 reportés dans le tableau IV-8 montrent qu'une concentration d'enzyme de 1.3 UI/mL est la meilleure pour une bonne rétention d'enzyme et un facteur d'efficacité maximal.

Le chlorure de calcium joue un rôle d'un gélifiant. Le tableau IV-8 montre que l'efficacité d'immobilisation et l'activité enzymatique de la peroxydase immobilisée est en maximum pour une concentration de 0.05M de $CaCl_2$. Pour une concentration supérieure à cette valeur, les billes d'alginate sont plus petites et plus rigides à cause de gélification, donc moins actives.

Il est bien connu qu'une enzyme immobilisée perd une partie de son activité suite à son immobilisation. Ce fait est attribuable à plusieurs facteurs dont le microenvironnement dans lequel l'enzyme est immobilisée. Elle subit des contraintes de charges ioniques ou d'encombrement stérique, mais il est important d'en réduire au maximum par une optimisation des conditions opératoires initiales dont la concentration du support, d'enzyme et de la solution de gélification. En résumé, les conditions optimales d'immobilisation de la peroxydase par inclusion dans les mailles d'alginate de calcium qui donnent un facteur d'efficacité maximale et un meilleur taux de rétention sont :

- Une concentration massique de 1.5% d'AG-Na,
- Une charge de 1.3UI/mL d'enzyme à immobiliser.
- Une concentration de 0.05Mde $CaCl_2$.

Dans ces conditions optimales déterminées on prépare à nouveau des billes d'alginates qui seront utilisées pour la suite de l'étude.

IV.3.3. Effet des paramètres opératoires sur la cinétique de décoloration du RC par la peroxydase immobilisée

IV.3.3.1. Effet du pH

L'histogramme reporté dans la figure IV-20 présente l'évolution du rendement de décoloration de RC en fonction de pH et souligne que l'immobilisation de la peroxydase par inclusion dans l'alginate de calcium se traduit par une diminution mesurable de l'activité enzymatique par rapport à celle de la peroxydase libre et par conséquent sur le rendement de décoloration. Ceci, parce que le milieu acide est le milieu favorable pour que la peroxydase donne son point d'activité maximale. Donc, si l'environnement des billes est acide, l'enzyme incorporée dans ces billes se trouve dans un milieu moins acide. Cette diminution de l'activité enzymatique due à l'immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de calcium a été observée dans les travaux de Maddhinni et al où la dégradation de jaune direct 12 a été réduite de 20% [124].

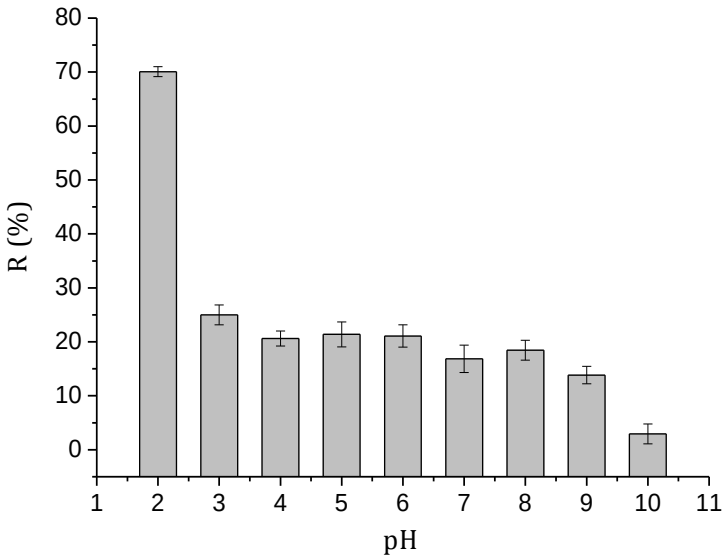


Figure IV-20: Effet du pH sur le rendement de décoloration du RC par la peroxydase immobilisée (t=1h ;T_{amb} ;[RC]= 50mg/L ; $[H_2O_2]$=0.05M ; m_{billes} = 0.7g).

IV.3.3.2. Effet du temps de contact

Les allures des cinétiques illustrées dans la figure IV-21 est analogue à celle traité par la peroxydase en solution mais la différence est apparait dans la diminution de l'activité enzymatique et le rendement de décoloration dû aux phénomènes de diffusion des substrats et des produits. La vitesse initiale est toujours déterminée par la tangente de la première partie linéaire et elle a été mesurée dans

les premiers dix minutes. Pour la suite de l'étude il suffit donc 10 minutes pour le déroulement de la réaction.

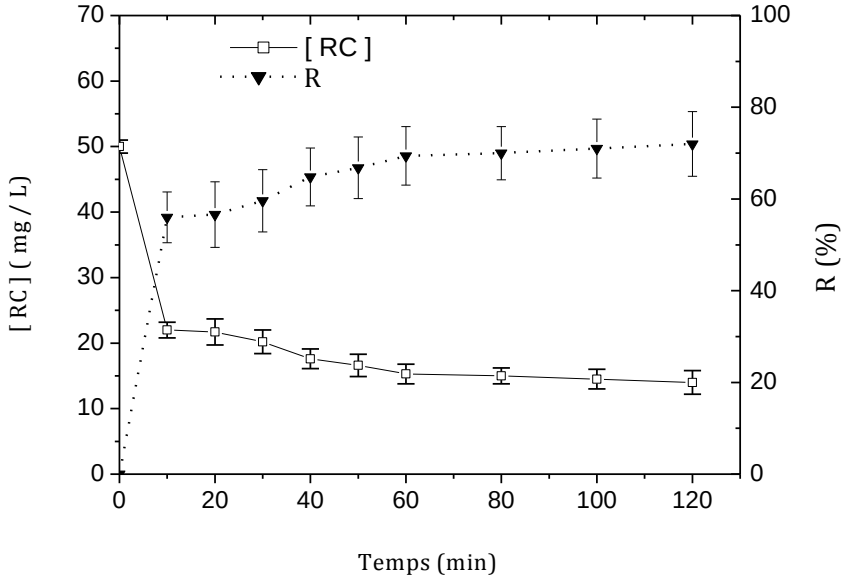


Figure IV-21: Cinétique et rendement de décoloration de RC avec la peroxydase immobilisée (pH=2.0 ; T_{amb} ; [RC]=50mg/L ;[H_2O_2]=0.05M ;m_{billes} = 0.7g).

IV.3.3.3. Effet de la température

A partir de l'histogramme introduit dans la figure IV-22, nous avons observé que l'immobilisation exerçait une influence sur l'activité enzymatique de la peroxydase si on fait varier la température et donne des résultats différentes par rapport à la peroxydase libre. Il est donc nécessaire d'en préciser l'importance. La température optimale est de valeur de 40°C (même température optimale déterminée lors de l'étude avec l'enzyme libre). Pour la suite de l'étude les expériences seront effectuées à la température ambiante.

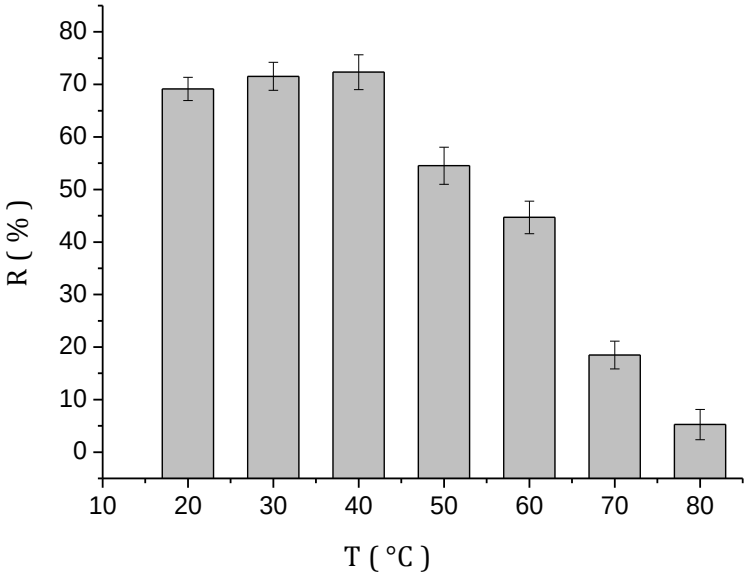


Figure IV-22: Effet de la température sur le rendement de décoloration du RC avec la peroxydase immobilisée (pH =2.0 ; t=10min ; [RC]=50mg/L ; $[H_2O_2]$=0.05 M ; m_{billes} = 0.7g).

IV.3.3.4. Effet de la concentration du colorant

Sur la figure IV-23 qui représente la courbe de cinétique et de rendement de décoloration on constate que la variation de la vitesse initiale présente une partie linéaire ascendante. La vitesse de transformation n'atteint sa valeur limite que pour des concentrations initiales en colorants très élevée par rapport à celles trouvées dans le cas de la peroxydase libre. La zone d'inhibition n'existe plus dans le cas du traitement du RC par la peroxydase immobilisée et le rendement de décoloration obtenu est acceptable, il est de l'ordre de 90%. Ces résultats ne sont que préliminaires vu qu'il existe encore des paramètres à optimiser. L'intersection des deux courbes de vitesse et de rendement donne la concentration optimale en colorant qui sera utilisée pour la suite de l'étude, elle est grande plus de trois fois par rapport à celle obtenue lors de l'étude avec la peroxydase libre, elle est de l'ordre de 180 mg/Let le rendement correspondant est de 86%.

L'immobilisation des enzymes affecte beaucoup leurs propriétés cinétiques. En effet, à la vitesse de réaction enzymatique proprement dite, il faut ajouter l'effet du microenvironnement qui conditionne toute l'activité catalytique. Ainsi, les phénomènes de diffusion limitent l'excès du substrat au niveau du site enzymatique, ce qui permet de réduire l'inhibition par excès de substrat, voire l'éliminer. Dans

certains cas les phénomènes de diffusion ont certains avantages, pour des solutions concentrés en colorant où peut occurer un phénomène d'inhibition par excès de substrat.

L'inhibition par excès de substrat sera diminuée puisque la peroxydase se trouve protégée contre les conditions enviromentales "agressives", Si le milieu extérieur des billes est encombré par les molécules de substrat, le milieu intérieur est moins chargé par ces molécules puisque la concentration en substrat diminue au fur et à mesure que l'on se rapproche de la surface des billes par l'extérieur de ceux-ci jusqu'à ce qu'elle devient minimale ou nulle au centre des particules. Ceci a pour conséquence une augmentation de la vitesse optimale et de la concentration de colorant optimale. Cette élévation de la concentration sous l'effet de l'immobilisation a déjà été observée par d'autres auteurs pour d'autres colorants traités par la peroxydase [124].

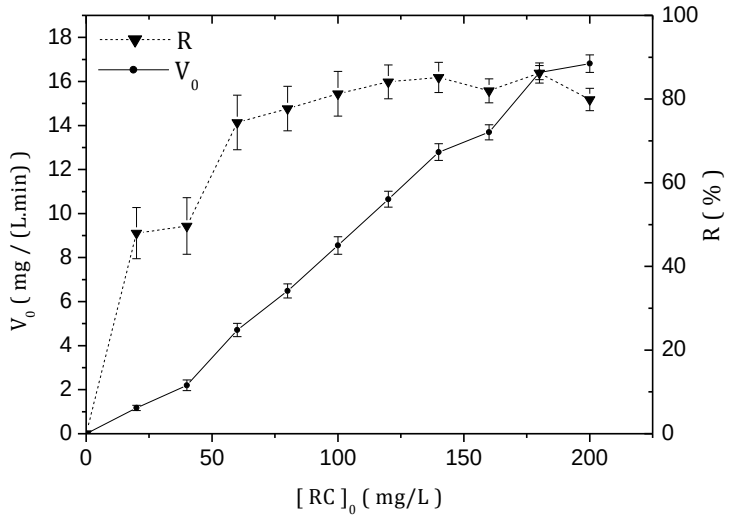


Figure IV-23: Vitesse et rendement de transformation du RC par la peroxydase immobilisée (pH=2.0 ; t=10min ; T_{amb} ; $[H_2O_2]$=0.05 M ; m_{billes} = 0.7g).

IV.3.3.5. Effet de la concentration du peroxyde d'hydrogène

Pour une concentration fixe et optimale en colorant, l'influence des différentes concentrations initiales de substrat peroxyde d'hydrogène sur l'activité enzymatique de la peroxydase immobilisée est représenté sur la figure IV-24. La variation de la concentration du peroxyde d'hydrogène sur la vitesse

initiale a un effet différent et inverse à ce qui remarqué lors de l'étude avec l'enzyme libre. Dans ce cas, la cinétique enzymatique n'obéit plus au modèle de Michaelis-Menten.

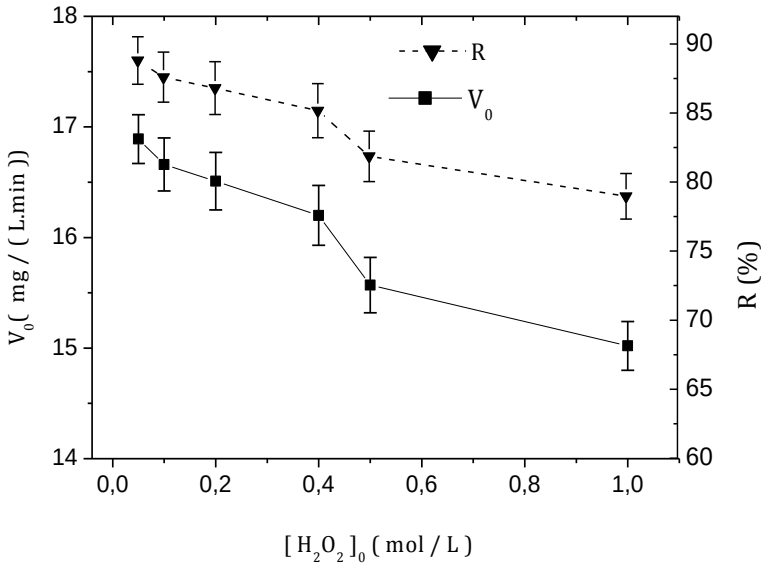


Figure IV-24: Variation de la vitesse initiale et le rendement de décoloration en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène (pH=2.0 ; t=10min ; T_{amb} ; [RC]=180 mg/L ; m_{billes} = 0.7g).

Ce changement peut être expliqué par un phénomène observé au cours de la réalisation des expériences où les billes d'alginate flottent à la surface de la solution pour des concentrations élevés en peroxyde d'hydrogène par contre pour des concentrations faibles, les billes se déposent en bas de tube (figure IV-25). Ceci, peut être expliqué par le fait que les billes soient remplies par des bulles de gaz qui les portent à la surface. Sachant que le peroxyde d'hydrogène à une propriété de dégager d'une manière intense de l'oxygène et surtout s'il est en forte concentration, donc cette propriété peut gêner et limiter l'action de la peroxydase.



Figure IV-25 : Position des billes d'alginate, (a) pour $[H_2O_2]_0$>0.01M, (b) pour $[H_2O_2]_0 \leq 0.01$M.

IV.3.3.6. Cinétique de décoloration dans les conditions optimales

L'allure de cinétique de transformation enzymatique du RC avec la peroxydase immobilisée dans les conditions optimales reporté sur la figure IV-26 sont similaires qualitativement mais néanmoins quantitativement différentes, à celles observées lors de l'étude avec l'enzyme libre. Auparavant on a obtenu un rendement de décoloration élevé pendant une durée très courte. Par contre dans ce cas une durée d'une heure est nécessaire pour dégrader 90 % de RC en produit précipité. En comparant les valeurs des vitesses initiales et les rendements de décolorations obtenues avant et après optimisation des conditions opératoires en utilisant la peroxydase immobilisée, on trouve que la réalisation de la dégradation du colorant azoïque RC dans les conditions optimales a pour but d'en augmenter.

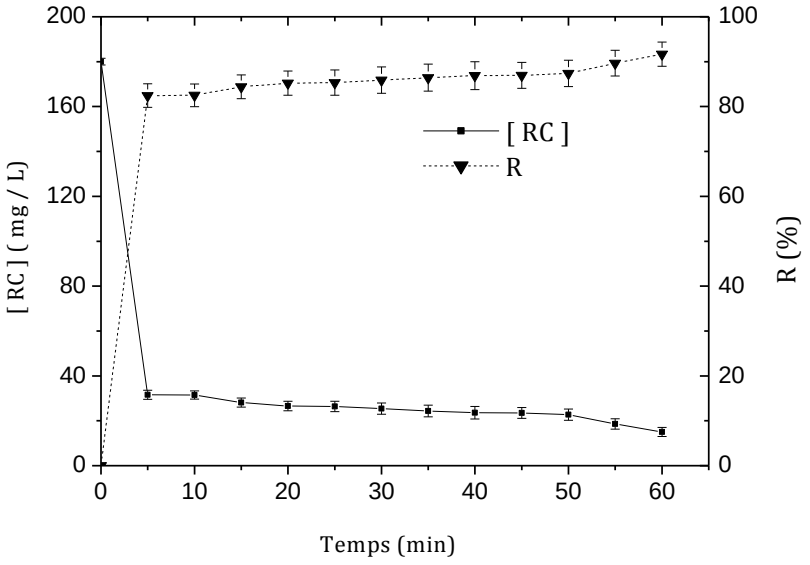


Figure IV-26: Cinétique et rendement de décoloration du RC par la peroxydase immobilisée dans les conditions optimales (pH=2.0 ; t=10min ; T_{amb} ; [RC]=180 mg/L ; $[H_2O_2]$=0.01 M ; m_{billes} = 0.7g).

IV.3.3.7. Traitement des colorants par la peroxydase immobilisée en batch successifs :

L'objectif est d'analyser la stabilité de l'enzyme après plusieurs utilisations successives en estimant le rendement de décoloration à chaque fois pour une durée fixe de traitement sous les conditions optimales. Les résultats sont représentés sur la figure IV-27 :

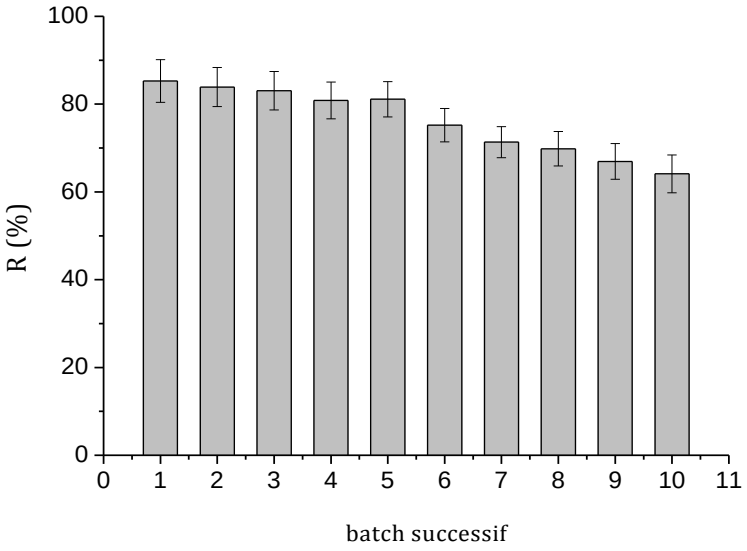


Figure IV-27: Rendement de décoloration du RC après chaque utilisation (pH=2.0 ; t=10min ; T_{amb} ; [RC]=180 mg/L ;$[H_2O_2]$=0.01 M ; m_{billes}=1g).

Le pouvoir catalytique des enzymes immobilisées peut être conservé et réutilisé grâce à leur fixation. Cette faculté est d'un intérêt primordial pour l'exploitation à l'échelle industrielle. Cependant, une fuite plus ou moins prononcée de l'enzyme peut provoquer la diminution de son activité ou du rendement de transformation. Une stabilité de l'activité peroxydasique dans la dégradation du RC est observée jusqu'au dixième batch. Pour une même quantité des billes on peut avoir une décoloration supérieure à 80% et 64% successivement après la cinquième et dixième utilisation. Donc, on peut dire que l'immobilisation est une opération efficace qui permet une utilisation pratique de la peroxydase dans la dégradation des colorants azoïques.

Des résultats comparables ont été trouvés en utilisant les alginates pour immobiliser les peroxydases de différentes sources destinées pour la dégradation des colorants azoïques. Boucherit et al [96] ont trouvé que la peroxydase extraite à partir de la courgette "*Cucurbita pepo"* et immobilisée dans l'alginate de calcium peut décolorer 35% du colorant azoïque jaune direct 106 après sa cinquième réutilisation. Dans un autre travail et avec utilisation d'un autre support de fixation Con A-Sephadex, Akhtar et al [174] ont étudié huit colorants appartenant dans la classe tinctoriale réactive, y compris six colorants ayant la fonction azoïque. Ils ont pu dégrader plus de 25% du colorant après la dixième réutilisation de la peroxydase extraite de la gourge amère "*Momordica charantia"* et immobilisée dans Con A-Sephadex [174].

IV.3.3.8. Discussion sur les phénomènes de diffusion

L'immobilisation par inclusion est une méthode simple et bien maîtrisable dans sa mise en œuvre. Elle permet en une seule étape, d'immobiliser la totalité de la masse d'enzyme mise en jeu. La méthode d'inclusion consiste à incorporer l'enzyme dans un gel insoluble constitué d'une matrice organique (polymère). Dans notre cas, la peroxydase est mélangée au matériau, l'alginate de sodium où elle se trouve piégée à l'intérieur des matrices polymériques. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme "la peroxydase" tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif de l'enzyme grâce à une porosité suffisante du gel. La localisation des molécules d'enzymes à l'intérieur du polymère ou du volume délimité par celui-ci, aura une implication sur le phénomène de transfert de masse du substrat de la solution à l'enzyme puis du produit de la réaction sortant vers la solution.

Aux phénomènes de diffusion extraparticulaires viendront donc s'ajouter les phénomènes de diffusions intraparticulaires limitant d'autant l'efficacité de l'action des enzymes immobilisées. On peut à partir de de la figure IV-28 interpréter le mécanisme de transfert de masse du colorant vers l'enzyme. Les substrats RC et peroxyde d'hydrogène se diffusent à travers le film de transfert à l'intérieur des billes oùla réaction se déroule puis le produit formé se diffuse lentement et de la même manière vers l'extérieur où il sera libéré facilement dans le milieu extérieur. Cela permet de retirer et séparer le produit aisément du milieu réactionnel.

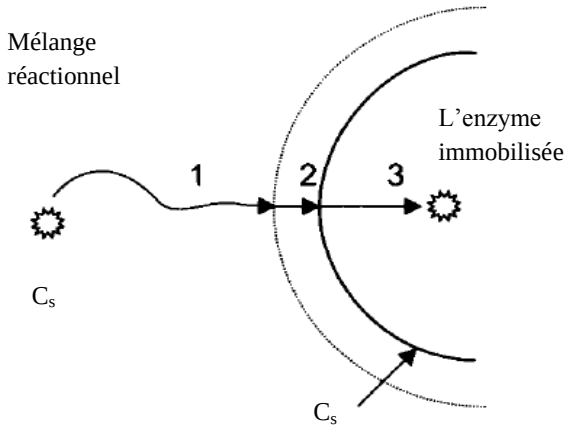


Figure IV-28 : Schéma illustrant la diffusion du substrat à l'intérieur des billes.

Afin de mesurer le facteur d'efficacité η il faut tracer tout d'abord sur le même graphique les vitesses initiales exprimées en une masse du substrat disparue par unité de temps et par unité enzymatique pour une variation de la concentration du colorant RC, la figure IV-30 montre la différence entre les vitesses de l'enzyme libre et immobilisée. Le rapport entre l'activité enzymatique de l'enzyme immobilisée et l'activité enzymatique de l'enzyme libre correspondant à la concentration maximale du colorant RC donnant une activité optimale avec l'enzyme libre nous permet de calculer le facteur d'efficacité η comme l'indique la figure IV-29.

Commentaire [c2]:

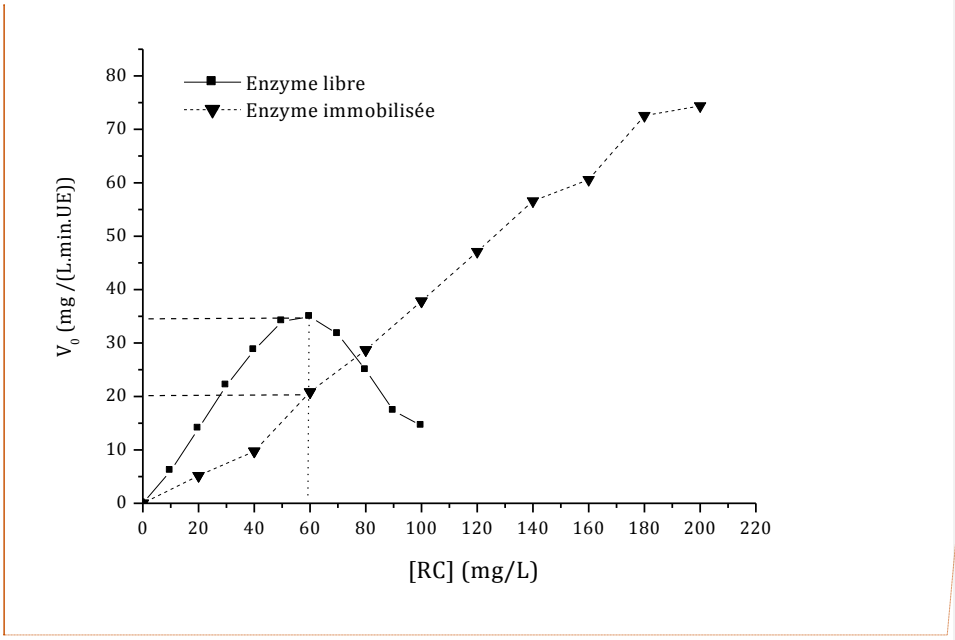


Figure IV-29 : Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat RC avec l'enzyme libre et immobilisée

Afin d'évaluer quantitativement l'effet des limitations difusionnelles sur la cinétique enzymatique globale, il est nécessaire de calculer deux paramètres importants :

- Le facteur d'efficacité η qui permet de quantifier l'écart du point de vue de cinétique globale entre le procédé à enzymes immobilisées et le procédé à enzymes libres,
- Le module de Thiele Φ qui reflète la concurrence entre le procédé cinétique et le procédé difusionnel.

Les deux paramètres adimensionnels : le facteur d'efficacité η et le module de Thiele Φ ont été calculés successivement par les équations II-4 et II-5 et les valeurs trouvées à partir des données cinétiques étaient de l'ordre de 0.598 et 1.215 respectivement.

Conclusion

Les suivis de cinétiques des réactions enzymatiques sont parmi les moyens d'approche les plus performants pour élucider les mécanismes catalytiques des enzymes. Une des premières mesures effectuées dans toute étude cinétique enzymatique est la détermination de la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat, qui nous conduit à la mesure d'autres paramètres, le plus important dans notre cas est le rendement de décoloration.

L'immobilisation d'une enzyme permet à la fois son utilisation dans un réacteur continu, sa récupération et sa réutilisation. Il est ainsi possible d'améliorer de manière très significative l'aspect technico-économique du procédé enzymatique, d'autant plus que le coût de l'enzyme est élevé. Ce bénéfice est très souvent augmenté par le fait que l'immobilisation se traduisant par une augmentation très significative de la stabilité de l'enzyme, en raison de la préservation de la structure tridimensionnelle active. Tous ces facteurs permettent une faisabilité d'un procédé continu à travers la conception d'un bioréacteur à base de l'enzyme immobilisée.

Les résultats obtenus montrent que l'enzyme peroxydase extraite à partir du navet, sous forme d'enzyme libre et immobilisée, permet de décolorer efficacement le RC sous des conditions physicochimiques de pH de 2.0 et sous une température de 40°C en présence de peroxyde d'hydrogène en concentration très faible (0.01 M). La peroxydase piégée dans les billes d'alginate de calcium peut traiter une solution de RC avec une concentration de 180 mg/L supérieure d'autant plus de trois fois à celle traitée par la peroxydase libre. Les résultats ainsi estimés le long de cette étude sont récapitulés dans le tableau IV-9 :

Tableau IV-9 : Conditions et résultats optimales obtenus par la peroxydase libre et immobilisée.

	Peroxydase libre	**Peroxydase immobilisée**
pH	2.0	2.0
Température (°C)	Ambiante	Ambiante
[RC] (mg/L)	50	180
[H_2O_2] (M)	0.05	0.01
[E] (UI/mL)	0.45	0.7g de billes
R (%)	100	92
Temps (min)	10	60
Batch successif	--	10 fois

Chapitre V. Décoloration du RC dans le réacteur à lit fixe à peroxydases immobilisées

Introduction

Compte tenu de la grande consommation de l'enzyme lors du traitement d'une quantité importante de l'effluent coloré, une opération continue dans un réacteur à lit fixe a été choisie, car il permet de traiter une charge importante de l'effluent avec une réutilisation de la même quantité d'enzyme par sa fixation dans un support. En effet, l'immobilisation d'une enzyme permet soit son utilisation dans un réacteur continu, soit sa récupération et sa réutilisation. Il est ainsi possible d'améliorer de manière très significative l'économie d'un procédé enzymatique, d'autant plus que le coût de l'enzyme est élevé. Ce bénéfice est très souvent augmenté par le fait que l'immobilisation se traduit par une augmentation très significative de la stabilité de l'enzyme, en raison de la préservation de la structure tridimensionnelle active.

Comme les réacteurs à lit fixe sont couramment utilisés dans les procédés à enzymes immobilisées, surtout pour le traitement d'eaux et d'effluents, donc on va utiliser ce type de bioréacteur dans notre cas. Deux bioréacteurs à lit fixe ont été utilisés avec des dimensions différentes en gardant toujours le même volume, le garnissage des deux bioréacteurs se fait par la peroxydase extraite et purifiée à partir du navet blanc "*Brassica rapa*" et immobilisée dans l'alginate de calcium. Le fonctionnement de ces réacteurs sera étudié et comparé dans les mêmes conditions opératoires pour une variation de débit hydrodynamique et de concentration en substrat colorant en n'oubliant jamais de tester leur stabilité de conduite.

Donc, la réalisation d'un réacteur enzymatique de type colonne garnie visant à éliminer un effluent synthétique contenant le colorant azoïque RC par la peroxydase immobilisée par inclusion dans le gel alginate de calcium sera étudiée et l'influence des conditions expérimentales favorisant l'obtention d'une décoloration totale sera fait.

V.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

V.1.1. Calcul de réacteur et dimensionnement approché :

Les bioréacteurs à lit fixe sont couramment utilisés dans le traitement d'eau et d'effluents. L'intérêt d'utiliser cette configuration plutôt que celle d'un autre bioréacteur est due au fait qu'elle permet le conduit des réactions enzymatiques hétérogènes à grande échelle. Ainsi l'étape de séparation du biocatalyseur et du produit pourra être évitée. Le bioréacteur à lit fixe permet aussi à la fois d'avoir une importante productivité, son dimensionnement se fait en établissant les bilans massiques sur un volume élémentaire de lit. On considère un réacteur à lit fixe constitué d'une colonne de diamètre Ø et d'une hauteur du garnissage H, remplie de particules sphériques de diamètre constant. Le réacteur est alimenté avec un débit D de milieu contenant une concentration du colorant azoïque RC bien déterminée selon le cas et l'effet de paramètre étudié.

L'objectif fixé par une modélisation d'un bioréacteur est de pouvoir calculer son volume total, et par conséquent estimer ses dimensions (diamètre et hauteur) qui nous permet de faire une conception du bioréacteur. Donc, à partir de l'étude avec la peroxydase libre et immobilisée et dans le but de dégrader le colorant RC dans le bioréacteur à lit fixe, un calcul de réacteur en présence de limitations diffusionnelles s'appuie sur les hypothèses et les données suivantes :

- Cinétique de dégradation du RC : ordre 1 avec v_{max}= 5.50 mg/L/min et K_s =65.8 mg/L.
- Rendement de décoloration envisagé : 99%
- Concentration initiale du RC : 50 mg/L
- Débit hydrodynamique : 150 mL/h.
- Le facteur d'efficacité η : 0.598.
- la porosité ε du lit garni par des particules sphériques : 0.4.

L'estimation de toutes ces grandeurs permet de faire un calcul du bioréacteur. Après une application numérique de l'équation II-8 :

$$\boldsymbol{V = \frac{K_s D \, ln \frac{[S]_0}{[S]}}{V_{max} \eta (1 - \varepsilon)}}$$

Le volume du bioréacteur de géométrie cylindrique sera donc :

V= 384 cm^3

Deux bioréacteurs à lit fixe ont été conçus, de diamètre et hauteur différents mais en gardant toujours le même volume afin d'étudier l'effet du rapport hauteur/diamètre (H/Ø) sur l'efficacité du bioréacteur enzymatique sur la décoloration du RC.

Le premier bioréacteur d'un diamètre large (Ø=5.0 cm). Sa hauteur correspondante sera donc H=20 cm, par conséquent le rapport H/Ø=4. Pour le deuxième bioréacteur, plus étroit, ses dimensions seront donc : Ø=3.5 cm, H=40 cm d'où H/Ø =11.4.

V.1.2. Description du dispositif expérimental :

Deux montages expérimentaux de même configuration ayant les dimensions précédemment calculées ont été réalisés (figure V-1). Ils comprennent essentiellement deux parties essentielles :

- Une colonne en verre, fixée à l'aide d'un support et remplie de particules sphériques d'alginate de calcium contenant une charge homogène de peroxydase. Ces particules ayant généralement une taille uniforme, sont bien entassées dans la colonne maintenue en position verticale.
- Une pompe d'aquarium immergée dans le mélange réactionnel a pour objectif d'alimenter le bioréacteur par les deux substrats (RC et peroxyde d'hydrogène) dissouts dans la solution tampon pH 2.0. Le mélange réactionnel qui circule à travers le lit garni est mis en contact avec les particules catalytiquement actives pour subir la transformation enzymatique. Le rétentat élué de la colonne sera dosé par le spectrophotomètre.

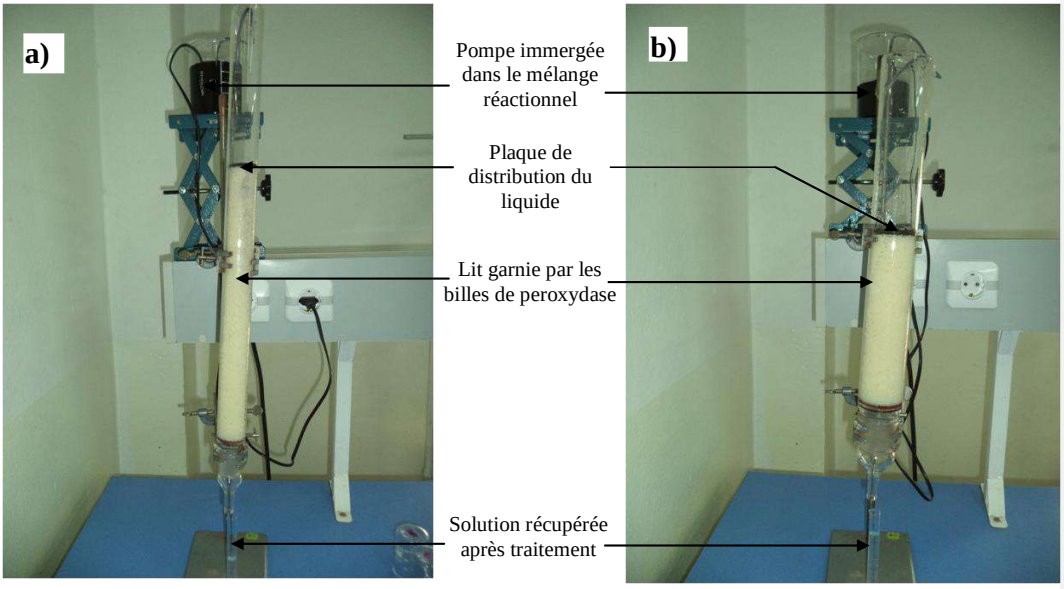


Figure V-1 : Photos des réacteurs à lit fixe à peroxydase immobilisée a) Bioréacteur de H/Ø =11.4, b)Bioréacteur de H/Ø=4

V.1.3. Etude des paramètres opératoires sur le rendement de décoloration du RC dans deux bioréacteurs à lit fixe

L'étape suivante consiste à étudier quelques paramètres physico-chimiques et hydrodynamiques dans le but d'optimiser le rendement de décoloration du RC par la peroxydase immobilisée. Cette étape vise à étudier l'influence de la concentration du substrat RC, du débit et de la stabilité des deux bioréacteurs lors de la décoloration du RC.

- **Effet de débit d'alimentation :** Le débit de la solution d'alimentation sera réglé par la pompe en fixant la concentration du substrat RC à 50 mg/L et celle du peroxyde d'hydrogène à 0.01M, les deux substrats sont préparés dans la solution tampon pH 2.0. Lors de réalisation de l'expérience, le traitement des solutions dans chaque bioréacteur a été réalisé en prenant les cinq premières fractions de volume de 10 mL pour une variation du débit entre 100 et 600mL/h.
- **Effet de la concentration du colorant :** Une fois le débit d'alimentation sera fixé, on procède de la même façon pour étudier l'effet de la concentration du colorant sur le rendement de dégradation du RC dans les deux bioréacteurs. La concentration du RC est comprise entre 40 et 280 mg/L.
- **Etude de la stabilité du bioréacteur** : La durabilité d'un procédé est l'un des critères de choix pour démontrer son efficacité. Pour cela, la stabilité de la performance sera testée lors du fonctionnement continu de 5h/jour des deux bioréacteurs sur une durée de 12 jours sous les conditions optimales de débit et de concentration du RC.

V.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

V.2.1. Effet du débit sur la décoloration du RC dans les deux bioréacteurs

Les rendements de décoloration du RC pour une variation de débit comprise entre 100 et 600 mL/h sont reportés dans les figures V-2 et V-3. Les résultats montrent que la décoloration dans le **BØ5** a une valeur maximale égale à 98% pour un débit de 100 mL/h. Au delà de cette valeur de débit, le taux de dégradation diminue jusqu'à une valeur de 80% pour un débit de 600 mL/h. Cependant, avec le **BØ3.5** (figure V-3) la décoloration est pratiquement totale pour un débit d'alimentation de 100mL/h. En plus, l'augmentation du débit ne provoque pas une diminution remarquable du rendement en comparant avec celui du bioréacteur **BØ5.**, Pour un débit de 600 mL/h, la biodégradation est de l'ordre de 96 %,

Ceci est expliqué par le fait que lorsqu'on augmente le débit, le temps de séjour de substrat qui traverse le lit du bioréacteur devient insuffisant pour permettre sa diffusion dans les billes d'alginates et par conséquent cela empêche d'avoir une conversion totale.

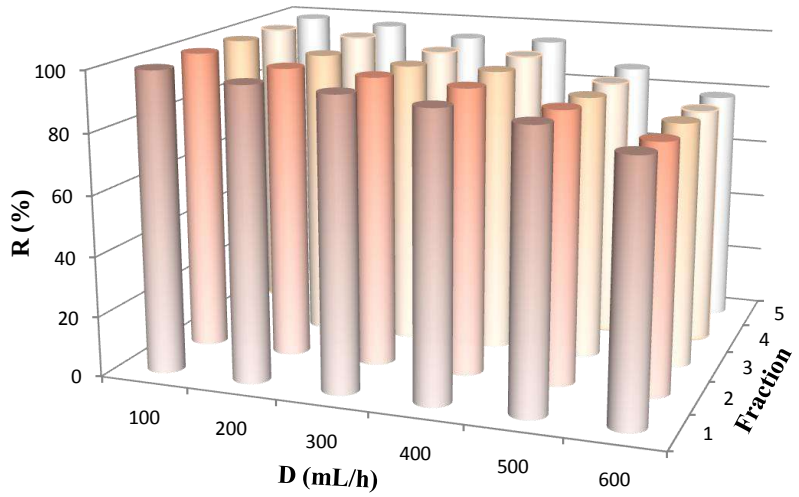


Figure V-2: Variation du rendement de décoloration du RC en fonction du débit pour cinq fractions de 10mL dans le BØ5 (pH_{opt} = 2 ; T_{amb} ; [RC]=50mg/L ; $[H_2O_2]$=0.01M).

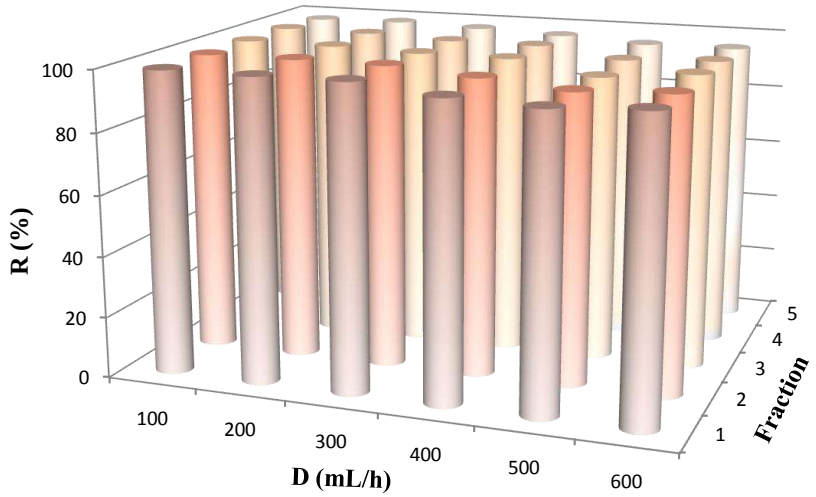


Figure V-3: Variation du rendement de décoloration du RC en fonction du débit pour cinq fractions de 10mL dans le BØ3.5 (pH_{opt} = 2 ; T_{amb} ; [RC]=50mg/L ; $[H_2O_2]$=0.01M).

Pour visualiser bien l'effet de débit d'alimentation sur le processus de décoloration dans les deux - bioréacteurs à lit fixe de dimensions différentes, on trace sur le même graphique les valeurs moyennes des cinq fractions en fonction de débit.

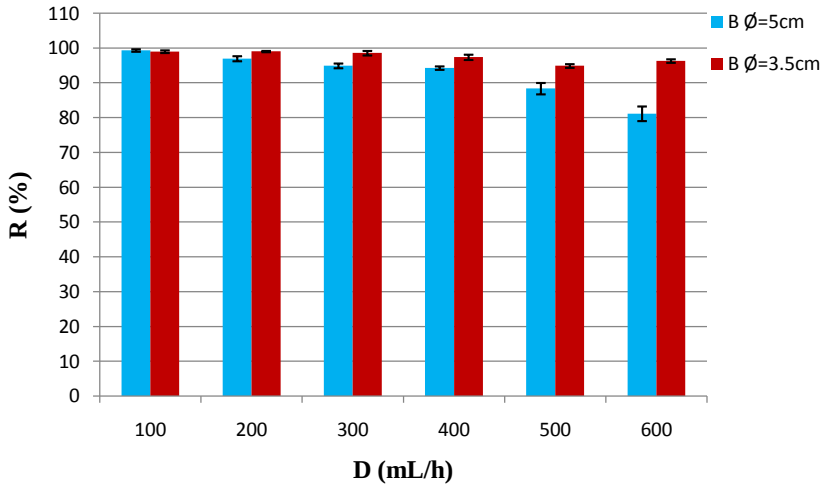


Figure V-4: Effet du débit sur le rendement de décoloration du RC dans les deux bioréacteurs (pH_{opt}=2 ; T_{amb} ; [RC]=50mg/L ; [H_2O_2]=0.01M).

Les résultats de la figure V-4 montrent que le taux de dégradation du RC dans les deux bioréacteurs de différentes dimensions est inversement proportionnel à la variation du débit d'alimentation mais cette diminution est très claire dans le bioréacteur **BØ3.5.** En conclusion, on pourra dire que la dégradation est meilleure dans le bioréacteur de H/Ø=11.4. Le débit choisi pour la suite de l'étude sera 100 mL/h. Ceci a été confirmé par plusieurs auteurs, lors du traitement des effluents industriels en utilisant un bioréacteur à lit fixe ; ces auteurs ont expliqué que les débits d'alimentation faibles entraineraient un bon contact entre l'enzyme et le substrat qui, à leur tour vont donner un taux significatif de dégradation du colorant [207].

V.2.2. Effet de la concentration du colorant sur la décoloration du RC dans les deux bioréacteurs

Les résultats représentés sur la figure V-5 montrent que le rendement de décoloration reste quasiment constant et prend une valeur de l'ordre de 92% pour des concentrations inferieures à 200 mg/L. Si on augmente la concentration au delà de 240 mg/L, la biodégradation du colorant diminue brusquement jusqu'à 75% pour une concentration de 280 mg/L. On constate, par ailleurs, que l'augmentation de la concentration du RC a pour effet de décroitre le taux de transformation du colorant. Par ailleurs la figure V-6 montre que le bioréacteur **BØ3.5** donne une biodégradation quasi totale pour toute la gamme étudiée de concentrations du RC.

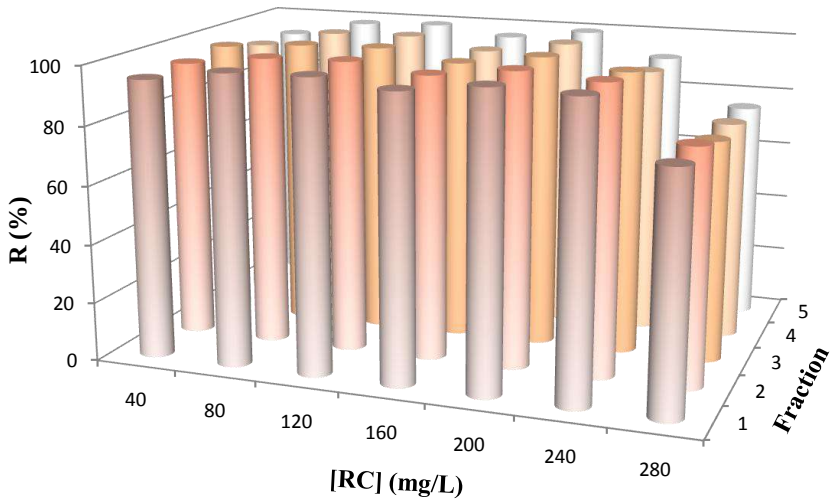


Figure V-5: Variation du rendement de décoloration en fonction de la concentration du RC pour cinq fractions de 10 mL dans le BØ5 (pH_{opt} = 2 ; T_{amb} ;D=100mL/h ; $[H_2O_2]$=0.01M).

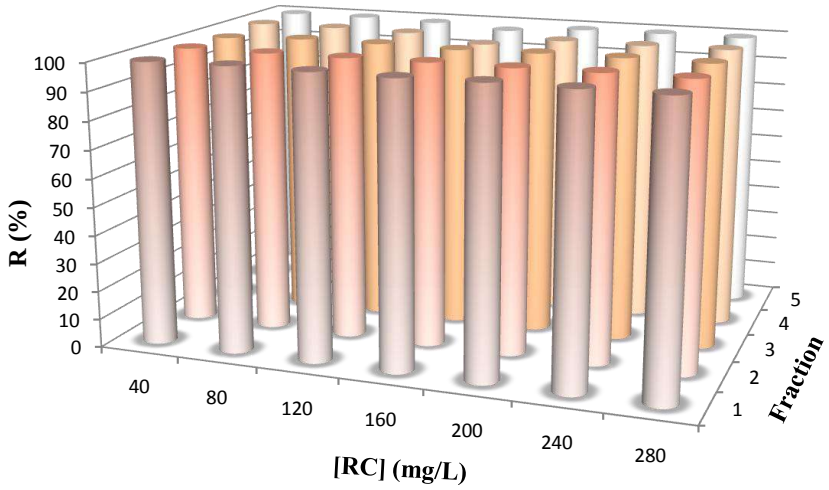


Figure V-6: Variation du rendement de décoloration en fonction de la concentration du RC pour cinq fractions de 10 mL dans le BØ3.5 (pH_{opt} = 2 ; T_{amb} ;D=100mL/h ; $[H_2O_2]$=0.01M).

Les rendements moyens tracés en fonction de la concentration initiale du RC sont illustrés sur la figure V-7.

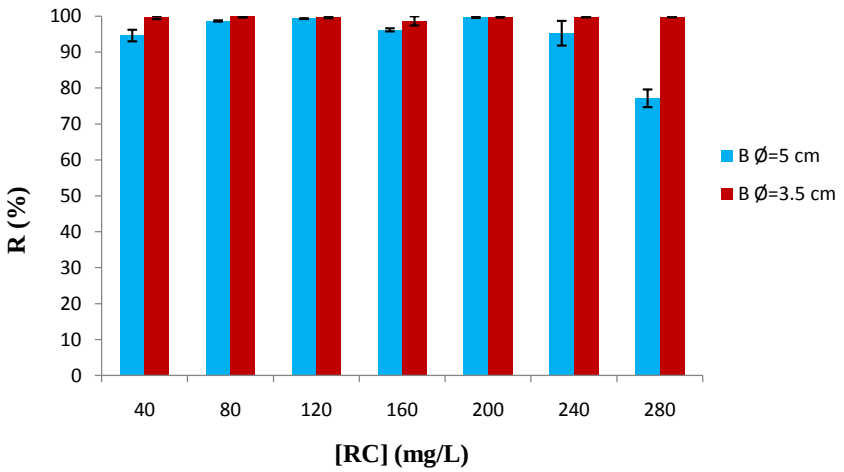


Figure V-7 : Effet de la concentration du colorant sur le rendement de décoloration du RC dans les deux bioréacteurs à lit fixe (pH_{opt} = 2 ; T_{amb} ;D=100mL/h ; $[H_2O_2]$=0.01M).

La figure V-7 montre une conversion totale du RC (98 à 100%) dans le bioréacteur **BØ3.5** (H/Ø=11.4) pour des concentrations comprises entre 40 et 280 mg/L. Alors que le bioréacteur **BØ5,** le rendement est de l'ordre de 90% pour des concentrations inférieures à 240 mg/L ; cependant, lorsqu'on augmente la concentration de RC à 280 mg/L, le rendement de décoloration chute jusqu'à une valeur de 77 %.

L'effet de la concentration du RC montre que la meilleure dégradation est obtenue dans le bioréacteur **BØ3.5** où le temps de séjour du fluide d'alimentation est plus important à celui du bioréacteur le plus large caractérisé par un rapport H/Ø=4. Pour la suite de l'étude la concentration choisie est 100mg/L. L'analyse graphique de ce paramètre montre que la concentration du colorant est le facteur le plus déterminant pour le traitement du RC.

V.2.3. Stabilité du fonctionnement du bioréacteur à lit fixe

Le but est d'étudier la stabilité de performance lors du fonctionnement en continu sur une longue durée. Les essais ont été menés sous les conditions opératoires optimales préalablement déterminées : débit de 100mL/h; concentration du colorant de 100mg/L. Les résultats de cette expérience sont illustrés sur les deux figures V-8 et V-9.

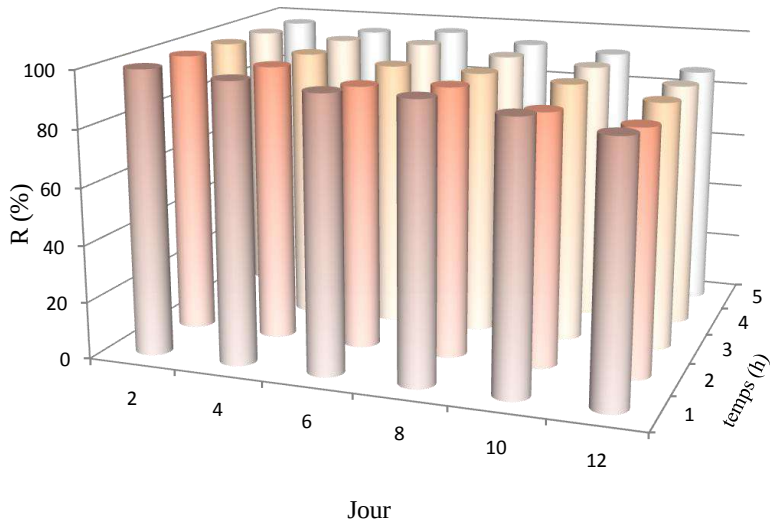


Figure V-8 : Stabilité de conduite du BØ5pour un fonctionnement de cinq heures par jour (pH_{opt} =2 ; T_{amb} ;$[H_2O_2]$=0.01M ; D=100mL/h, [RC]=100mg/L)

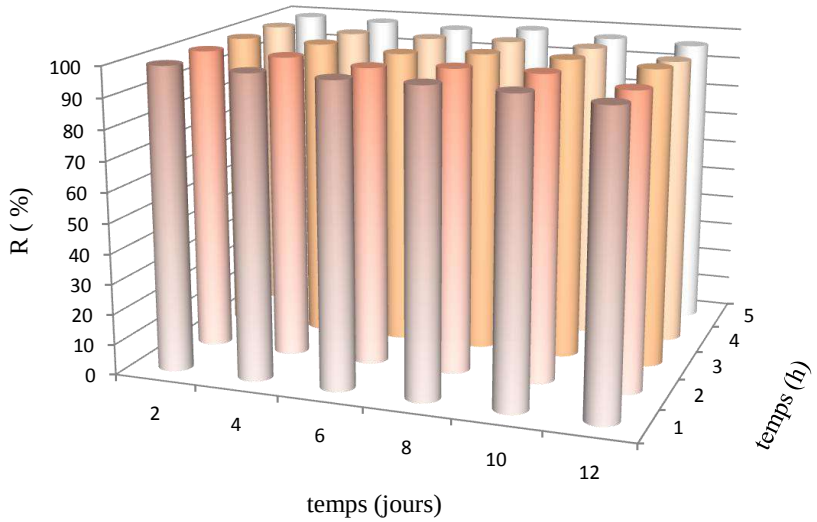


Figure V-9 : Stabilité de conduite du BØ3.5 pour un fonctionnement de cinq heures par jour (pH_{opt}=2 ; T_{amb} ;$[H_2O_2]$=0.01M ; D=100mL/h, [RC]=100mg/L)

Les résultats présentés sur la figure V-8 correspondant au bioréacteur **BØ5**, montre que malgré une diminution progressive du rendement en fonction de temps, on observe qu'après 10 jours, le pourcentage de décoloration reste acceptable et prend une valeur moyenne de 80%. Une meilleure performance est obtenue avec le bioréacteur de **BØ3.5**. En effet, la figure V-9 montre que le taux de

conversion du RC reste stable pendant 12 jours et prend une valeur de plus de 95%. Une meilleure visualisation des résultats est illustrée sur la figure V.10.

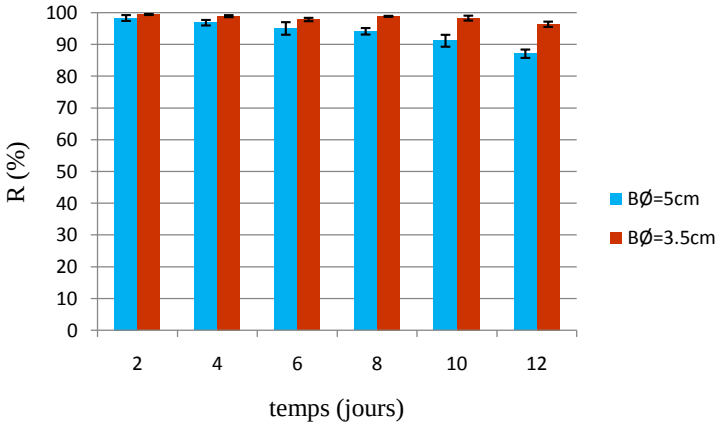


Figure V-10 : Stabilité de dégradation du RC dans deux bioréacteurs pendant 12 jours (pH_{opt} =2 ; T_{amb} ; $[H_2O_2]$=0.01M ; D=100mL/h ; [RC]=100mg/L)

La baisse de performance peut etre due à plusieurs facteurs tels que le colmatage des pores des billes d'alginate par le produit de la réaction, ce qui limite la diffusion du colorant vers l'intérieur des billes d'alginate. La réaction devient alors de plus en plus lente, ce qui conduit à la diminution du rendement de biodégradation du colorant. La figure V-11 présente l'aspect de l'eau de rinçage du lit des bioréacteurs à la fin du traitement où la décantation de précipité obtenu après la décoloration du RC est observée au fond du bécher. Un cycle de rinçage pourra donc être recommandé après chaque traitement afin de garder une performance stable.



Figure V-11: Aspect de l'eau de rinçage des bioréacteurs après chaque traitement de décoloration.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus par différents auteurs sur l'utilisation des bioréacteurs à lit garnis par la peroxydase immobilisée. Récemment, un effort a été fait pour dégrader

la benzidine par la peroxydase immobilisée dans l'alginate de calcium dans un réacteur à lit horizontal, l'efficacité d'élimination de la benzidine était de 40% après un mois de son fonctionnement continu [208].

Conclusion

Dans la configuration du réacteur à lit fixe, la colonne est remplie par le biocatalyseur immobilisé, et le fluide d'alimentation passe à travers de ce lit. Ce type de réacteur a un fonctionnement semblable au réacteur de type piston, ses avantages résident dans la facilité de mise en œuvre et dans le faible coût. Dans cette partie expérimentale, une première étape consiste à faire un calcul du réacteur avec des modèles simples. Afin de faire un rapprochement avec un cas idéal, des calculs ont été effectués en envisageant un réacteur ayant un comportement de type piston en se basant sur certaines hypothèses et en utilisant les données expérimentales obtenues lors de l'étude de cinétique de dégradation du RC avec la peroxydase libre et immobilisée.

Le fonctionnement de ce type de bioréacteur a été testé sous différentes conditions géométriques, hydrodynamiques et physico-chimiques dans le but de déterminer les conditions optimales donnant le rendement maximal d'élimination. A la lumière des résultats obtenus il a été conclu que le bioréacteur **BØ3.5** ayant un diamètre réduit et par conséquent le temps de séjour le plus long a donné la meilleure performance pour une concentration en RC de 100 $mg.L^{-1}$ lorsqu'il était alimenté à un débit de $100mL.h^{-1}$. Le même bioréacteur a montré aussi une stabilité remarquable lors d'un fonctionnement en continu durant une période de 12 jours.

Chapitre VI. Caractérisation et identification des produits obtenus après traitement enzymatique

Introduction

La majorité des réactions enzymatiques à deux substrats réagissent pour donner deux produits. Dans notre cas la disparition de colorant est suivie par l'apparition d'autres produits. Le précipité obtenu après une réaction enzymatique d'oxydoréduction par la peroxydase de navet est récupéré, séché et broyé afin de le comparer analytiquement au colorant de départ et identifier sa composition par les spectroscopies UV-Visible et IR. Le test de toxicité et de phytotoxicité est l'une des approches qui permet d'évaluer la classe de toxicité des produits formés en vue d'une éventuelle possibilité de recyclage des eaux traitées.

VI.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

VI.1.1. Analyse des solutions

- **Test par UV-Visible :** La nature de surnageant obtenu après décoloration de la solution et séparation du précipité est détectée par analyse de spectre d'absorbance dans le spectrophotomètre UV-Visible en le comparant avec la solution du colorant n'ayant subi aucun traitement.
- **Test de phytotoxicité :** Les solutions de colorant à 100 mg/L et de surnageant seront utilisés pour l'irrigation de 9 graines de fèves "*Vicia faba"* pendant 10 jours en comparant avec un test témoin à base de l'eau distillé.

VI.1.2. Analyse des produits précipités

- **Analyse par FTIR :** Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR dans la plage de 400–4000 cm^{-1} sur des pastilles de KBr contenant le précipité obtenu après la traitement enzymatique en comparant avec le spectre du colorant non traité.
- **Test de toxicité :** Le but de ce test est de déterminer la classe de toxicité du produit précipité suite à la transformation enzymatique. Nos expériences ont été effectuées sur huit lots de souris, chaque lot contient six souris en utilisant des doses choisies de façon arbitraire entre 1mg/kg et 1 g/kg en englobant les cinq classes de toxicité. Les souris destinées pour le test sont de masse entre 17 et 22 g et l'administration des échantillons des produits se fait par voie orale (le gavage) en donnant 0.5 mL de la solution pour chaque souris. L'observation des anomalies et de mortalité se fait dans les 14 jours qui suivent l'administration du produit à tester.

VI.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

VI.2.1. Analyse des solutions

VI.2.1.1. Analyse spectrale UV-Visible :

Les spectres d'absorbances du colorant et de son surnageant obtenu après traitement illustrés dans la figure VI-1 montre clairement que le colorant RC possède deux pics principaux dans les deux domaines UV-Visible. Le surnageant n'absorbe pas dans le visible alors on peut dire que cette solution ne contient pas le chromophore -N=N- ni les structures aromatiques issues de la molécule mère.

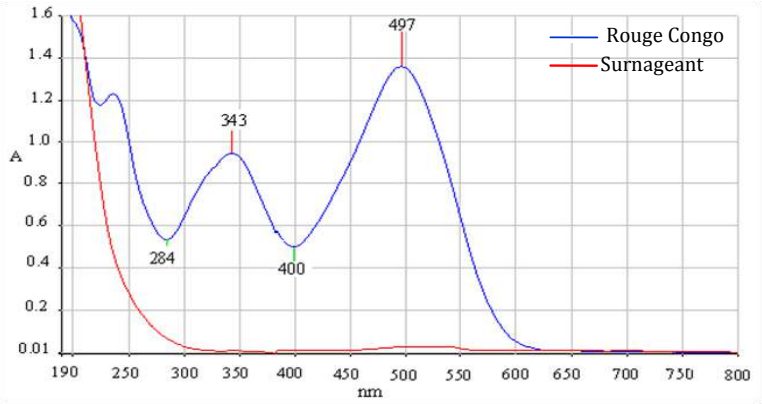


Figure VI-1: Spectre d'absorbance du RC et son surnageant obtenu après traitement enzymatique dans l'UV-Visible

Les photos présentées sur la figure VI-2 montrent aussi que la solution obtenue après traitement enzymatique par la peroxydase de navet "*Brassica rapa*" est constituée d'un précipité bien déposé au fond du tube et un surnageant incolore très limpide.

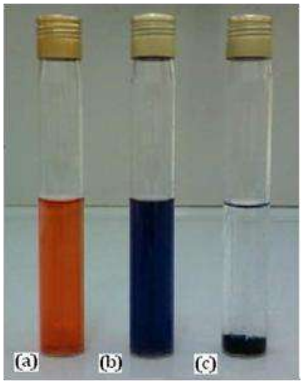


Figure VI-2: État des solutions du colorant azoïque RC avant et après le traitement enzymatique(a) : RC + l'eau distillé ; (b) : RC + pH 2.0 ; (c) : RC + pH 2,0 + peroxydase

VI.2.1.2. Test de phytotoxicité :

La libération des effluents colorés issus de l'industrie textile dans l'environnement peut détériorer la qualité de l'eau de surface. Cette eau peut être réutilisée à des fins agricoles. L'utilisation de ces eaux usées teintés non traitées a un impact direct sur la fertilité des sols. Ainsi, il était nécessaire pour évaluer la toxicité de colorant azoïque RC avant et après la dégradation.

Pour cela, une étude de phytotoxicité a été effectuée à température ambiante en utilisant des graines de plantes *Vicia faba*. Les graines de plante ont été testées avec des solutions du colorant RC et du surnageant après traitement enzymatique pour évaluer les toxicités de ces dernieres vis-à-vis des plantes. Cette toxicité se répercute généralement sur l'évolution des plantes dans un milieu naturel. Le contrôle a été effectué en utilisant de l'eau pure sous les mêmes conditions. Des expériences ont été effectuées en triplicate pour confirmation. Le taux de germination (%), la longueur des tiges, des racines, des feuilles même leur nombre ont été enregistré après10 jours et les résultats sont illustrés dans le tableau VI-1 :

Tableau VI-1 : Résultat de la phytotoxicité du colorant RC et son surnageant sur la germination des graines de fèves "*Vicia faba"*

Grandeurs mesurés	Eau	RC	Surnageant
Taux de germination (%)	100	89	100
Longueur des tiges (cm)	22.35±0.64	18.22±0.67	20.12±1.76
Longueur des racines (cm)	19.40±0.42	18.40±1.04	18.60±1.04
Nombre des feuilles	7.00±1.00	6.00±0.00	7.00±1.00
Longueur des feuilles (cm)	5.30±0.10	4.90±0.28	5.07±0.17

Le tableau VI-1 représente les analyses de phytotoxicité des graines de fèves *Vicia faba* sur le colorant RC et son surnageant obtenu après traitement enzymatique en se référant au témoin eau distillée. Le test a donné une germination totale des graines de fèves "*Vicia faba"* irrigués par le surnageant alors que cette germination est réduite à 89% pour les graines irrigués avec le colorant RC de concentration de 100 mg/L.

La longueur moyenne des tiges, des racines et des feuilles des graines de fèves ont été révélé « normaux » de 20.12cm, 18.60cm et 5.07 cm, respectivement, lorsqu'ils sont traitées avec l'effluent ou le surnageant du réacteur à lit fixe. En revanche, ces paramètres ont diminué et le nombre de feuilles a été réduit lorsqu'ils sont traités avec le colorant azoïque RC en comparant avec le test contrôle (tableau VI-1).



Figure VI-3: Germination des graines de fèves après dix jours d'irrigation par l'eau distillé (témoin), la solution de RC, et le surnageant.

Au vu de ces résultats, il a été observé que le colorant RC affecte également la germination des graines. Il pourrait être dû à l'incapacité des graines de fèves *Vicia faba* à utiliser de colorant comme seule source d'éléments nutritifs. En outre, les plantes cultivées avec l'effluent traité par la peroxydase avaient une bonne croissance continue et étaient capables de produire plus de feuilles. Il s'avère donc que les tests de phytotoxicité révèlent que les métabolites générés après la biodégradation enzymatique du RC sont moins toxiques par rapport au colorant. Nos résultats sont en accord avec des études antérieures, où la même constatation a été rapporté par Satar et al [209], lors de leur étude de phytotoxicité sur les graines d'*Allium cepa* sur deux colorants réactifs traités dans un réacteur à lit fixe par la peroxydase extraite de radis blanc *Raphanus sativus.*

VI.2.2. Caractérisation des produits précipités suite à la transformation enzymatique

VI.2.2.1. Analyse par FTIR :

Les spectres Infrarouge du colorant azoïque utilisé le long cette étude et de son produit précipité sont rapportés sur les figures VI-4 et VI-5.

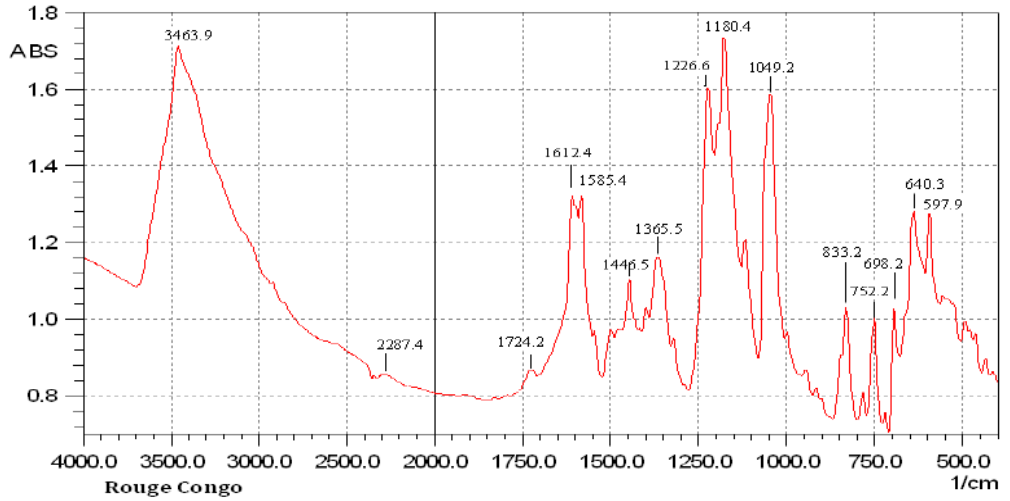


Figure VI-4: Spectre IR du rouge Congo.

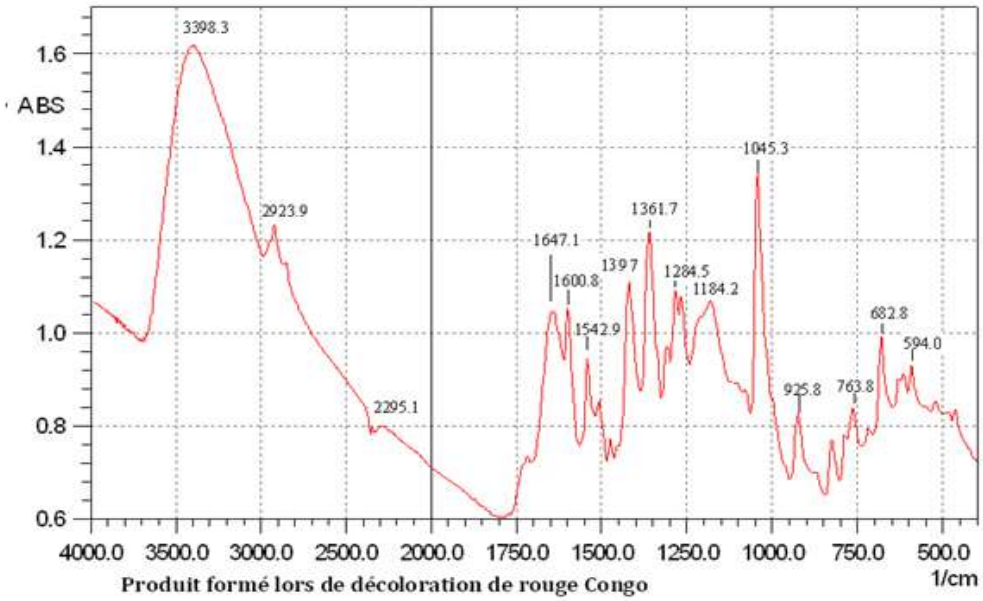


Figure VI-5: Spectre IR du produit formé suite à la transformation enzymatique du RC

Les positions des bandes et les intensités sont indiquées dans les tableaux VI-2 :

Tableau VI-2: Étude comparative des positions et d'intensités des bandes IR de RC et le produit formé après sa décoloration.

Intervalle de nombre d'onde (cm^{-1})	Rouge Congo		Produit précipité	
	Nombre d'ondes (cm^{-1})	Intensité	Nombre d'ondes (cm^{-1})	Intensité
500-1000	597.9 ; 640.3 ;752.2 ; 833.2	Moyenne Moyenne	594.0 ; 763.8 ; 925.8 682.8	Faible Moyenne
1000-1400	1049.2 1180.4 1226.6 1365.5	Forte Très forte Forte Moyenne	1045.3 1184.2 1284.5 1361.7	Forte Moyenne Moyenne Moyenne
1400-1500	1446.5	Moyenne	1397	Moyenne
1500-2000	1585.4 1612.4	Moyenne Moyenne	1542.9 1600.8 ; 1647.1	Faible Moyenne
2000-4000	3463.9	Forte	3398.3	Forte

L'étude comparative entre le colorant et son produit formé après la transformation enzymatique par la peroxydase de navet "*Brassica rapa*" consiste à mettre en évidence l'apparition ou la disparition de certaines bandes de façon très significative. A partir des spectres et d'après le tableau VI-2 les informations suivantes peuvent être retirées [210]:

- La zone du nombre d'ondes comprise entre 500 et 1000 cm^{-1} se présente très encombrée et plus intense dans le spectre du colorant que dans le spectre de son produit, à cause des bandes caractéristiques des cycles aromatiques. Donc, des ruptures peuvent avoir lieu soit au niveau des cycles, soit au niveau des chromophores et auxochromes.
- Dans l'intervalle entre 1000 et 1400 cm^{-1}, les pics d'absorbance sont presque les mêmes pour le colorant azoïque et son produit formé après la transformation enzymatique par la peroxydase mais ils sont plus intenses pour le colorant azoïque que pour le produit précipité. Cette intensité importante est dûe à l'absorbance du substituant dans le noyau aromatique conjugué avec la liaison –C–N=, puis cette intensité décroit pour le produit puisque il y a un clivage de cette fonction, donc, la rupture de la liaison azo.
- Le Fèvres et ses collaborateurs ont examiné 43 dérivés azo et diazo en arylazo-arènes, et ils ont suggéré pour ces échantillons que, la bande d'absorption -N=N- se trouve dans la zone 1400-1450 cm^{-l} [211]. La figure représente le spectre d'absorbance du colorant azoïque RC, et possède la bande d'absorbance : 1446.5 cm^{-l} attribuée au groupe azo. Ce pic est disparu dans le spectre du produit précipité du colorant azoïque après traitement enzymatique.

- Dans La zone s'étendant de 1600 à 1650 cm^{-1}, il y a une apparition une nouvelle bande à 1647.1 cm^{-1} dans le spectre du produit précipité suite à la transformation enzymatique du RC attribuée à la liaison NH_2 du groupement R-NH_2. La fonction azo a été donc remplacée par la liaison amide dans le précipité. Dans le spectre du produit, il y a une apparition d'une nouvelle bande à 3398.3 cm^{-1} attribuée à la liaison NH_2 du groupement R-CO-NH_2.

VI.2.2.2. Test de toxicité

L'analyse des produits de la transformation enzymatique dans l'effluent ou dans les précipités n'est qu'une approche permettant de mieux comprendre les mécanismes réactionnels. Du point de vue environnemental, il est nécessaire de garantir que le procédé proposé n'engendre pas un autre type de pollution ou des produits de dégradation qui soient à leur tour polluants ou toxiques, ce qui pourra nécessiter par la suite un traitement ultérieur. Pour cela, donc, des tests de toxicité ont été menés sur les produits obtenus après traitement enzymatique. La toxicité est définie comme la capacité inhérente à une substance de produire un effet délétère sur l'organisme [212]. Il existe trois types de toxicité :

a. *Une toxicité aigüe* : définie comme les effets adverses survenant dans un court laps après administration d'une dose unique ou multiple sur 24 heures [213].

b. *Une toxicité subaigüe ou subchronique (à moyen terme)* : Elle résulte de l'absorption répétée d'une substance pendant un temps limité (au maximum 90 jours chez l'animal) à des doses relativement élevées [214].

c. *Une toxicité chronique (à long terme)* : On ne saurait trop souligner que les effets toxiques ne résultent pas seulement de l'absorption, en un court espace de temps, de doses relativement fortes, mais aussi très souvent de l'absorption de doses même très minimes. En tout cas, ces doses sont beaucoup trop faibles pour entrainer des effets de toxicité aigüe, dont la répétition finit par provoquer des intoxications beaucoup plus insidieuses, car elles apparaissent, en général, sans aucun signe d'alarme [215].

Les classes de toxicité reportées dans le tableau VI-3 sont subdivisées en cinq catégories selon les valeurs des doses létales médianes DL_{50} :

Tableau VI-3: Valeurs de DL_{50} pour les différentes classes de toxicité

Classe de toxicité	**Valeur de DL_{50}**
Produit extrêmement toxique	$DL_{50} \leq 5$ mg/kg
Produit très toxique	DL_{50} entre : 5 et 50(mg/kg)
Produit toxique	DL_{50} entre : 50 et 500(mg/kg)
Produit peu toxique	DL_{50} entre : 500 et 5000(mg/kg)
N'est pas toxique ou l'est très peu	DL50 $\geq$5000 (mg/kg)

Sachant selon les valeurs de DL_{50} mentionnées dans le tableau d'identification du colorant azoïque donnée au début de la partie expérimentale que le RC est considéré comme un produit toxique. Le traitement enzymatique du RC par la peroxydase de navet donne la naissance à un nouveau produit, il semble donc intéressant de tester et d'évaluer sa toxicité afin de le comparer avec le colorants azoïque à traiter et d'estimer l'intérêt de ce traitement enzymatique. Le tableau VI-4 montre qu'il n'y a aucune anomalie, ni mortalité des souris après l'administration du produit formé suite à la transformation enzymatique. Le produit est donc considéré comme non toxique et la détermination de la DL_{50} est inutile.

Tableau VI-4: Essaie de la toxicité aiguë du produit formé suite à la transformation enzymatique du RC par la peroxydase du navet

Numéro de Lot	Dose du colorant (mg/kg)	Nombre de souris	Mortalité
Lot 1	1	6	0
Lot 2	5	6	0
Lot 3	25	6	0
Lot 4	50	6	0
Lot 5	100	6	0
Lot 6	250	6	0
Lot 7	500	6	0
Lot 8	1000	6	0

Conclusion

Le traitement des effluents contenant des colorants azoïques conduit à la formation de produits précipités, facilement séparables. L'élimination du produit de réaction sous forme d'un complexe insoluble est un signal important pour la détoxification enzymatique des colorants azoïques contenus dans les rejets industriels.

A travers ce chapitre, une caractérisation et une identification complète des produits générés lors du traitement enzymatique du RC ont été menées : des analyses sur le surnageant et sur le produit précipité ont ainsi été décrits successivement. Les analyses spectrales et le test de phytotoxicité montrent que le surnageant ne contient plus des composés aromatiques ni de produits toxiques, ce qui conduit à l'utiliser dans l'irrigation des sols. La même constatation a été obtenue sur le produit précipité où le test d'IR prouve qu'il ne contient plus la fonction azoïque ce qui le rend non toxique tel que révélé par les tests sur les souris.

Enfin, sur la base de cette étude expérimentale et compte tenu de ces résultats, on peut dire que le procédé enzymatique par utilisation des peroxydases est efficace pour la dégradation des colorants textiles. En effet, même s'il reste encore de la matière organique à la fin du traitement, cette dernière existe sous forme insoluble, biodégradable et non toxique.

Conclusion générale

L'utilisation des enzymes dans le contexte du traitement des effluents colorés est un sujet d'actualité. Le choix de la source d'enzyme est crucial pour la conduite de cette dégradation vu la diversité des sources d'enzymes et le caractère spécifique du polluant. La disponibilité des peroxydases très stables et actives dans des sources peu coûteuses peut ouvrir des portes pour le développement d'un système catalytique avec des applications commerciales et environnementales à large spectre. La peroxydase de navet s'est révélée être la plus stable et la plus active pour le traitement de pollution par les colorants. L'immobilisation des enzymes par inclusion est attrayante comme technologie dans l'élimination des colorants azoïques, que ce soit dans des systèmes continus ou discontinus dans des environnements clos. Néanmoins, il est primordial d'effectuer une étude approfondie du point de vue cinétique afin d'optimiser tous les paramètres permettant de réaliser la meilleure performance d'élimination des colorants sous les conditions physico-chimiques les plus modérées et les plus favorables. De même, il est impératif de chercher la bonne configuration du bioréacteur à enzyme immobilisée pour la mise en œuvre efficace et durable du procédé de traitement.

L'utilisation des bioréacteurs à lit fixe dans le traitement des effluents chargés par les colorants répond à ces deux objectifs principaux.

Tout au long de cette étude, nous avons traité un colorant azoïque le rouge Congo très utilisé industriellement par un procédé enzymatique qui met en œuvre la peroxydase extraite à partir de navet blanc "*Brassica rapa*". La peroxydase était obtenue à partir d'une source peu coûteuse et très disponible, sa purification par l'acétone permet d'obtenir un extrait partiellement purifié stable pour une durée qui dépasse trois mois. Le support d'immobilisation et de fixation de l'enzyme "alginate de sodium" conduit à d'intéressants avantages, son coût justifie aussi son emploi.

Les recherches développées dans le cadre de ce travail de thèse avaient pour principal objectif d'identifier le poids d'utilisation des enzymes et plus particulièrement les peroxydases dans l'élimination des colorants dans des bioréacteurs à lit fixe garnie par l'enzyme immobilisée par inclusion dans les billes d'alginates de calcium. Pour cela, Notre objectif consistait d'une part : au calcul des paramètres cinétiques de l'enzyme peroxydase pour les deux formes libre et immobilisée et d'autre part d'exploiter ces données et les constantes cinétiques pour la conception et la réalisation d'un bioréacteur à lit fixe.

Les résultats ont montré que la peroxydase donne son point d'activité maximale de dégradation du RC dans un milieu acide de pH 2.0 et sous une température de 40°C avec les deux formes d'enzyme libre et immobilisée. Les conditions optimales pour une élimination maximale de la couleur par la

peroxydase libre ont été : 50 mg/L du colorant RC, 50 mM de peroxyde d'hydrogène, et une activité peroxydasique de 0,45 U/mL durant un temps de 10 min. Cependant, la peroxydase immobilisée par inclusion dans l'alginate de calcium a donné une décoloration maximale à une concentration plus élevée de colorant de 180 mg/L et à une concentration plus faible de peroxyde d'hydrogène de 10 mM. Le but principal de l'immobilisation est atteint, on peut récupérer et réutiliser la peroxydase plus de dix fois. Les cinétiques de dégradation ont été établies avec l'enzyme libre et immobilisée et l'influence de l'effet des limitations diffusionnelles du colorant dans les billes d'alginate a été mise en évidence.

En ce qui concerne la diffusion interne, il nous faut étudier son importance pour les deux réactifs : le colorant RC et le peroxyde d'hydrogène. Certains paramètres nécessitent tout d'abord la connaissance de la vitesse de réaction intrinsèque et ils peuvent être calculés afin de quantifier la contribution de transfert de masse par diffusion dans des particules de support sur le taux de processus de transformation globale. Le calcul du facteur d'efficacité défini comme le rapport entre la vitesse apparente et la vitesse intrinsèque et le module de Thièle décrit par le rapport entre la vitesse de réaction à la surface du catalyseur et le flux de diffusion maximum nous permet de déterminer le phénomène limitant une réaction catalytique hétérogène.

Les paramètres cinétiques ont permis par la suite de procéder au calcul du réacteur à lit fixe sous les conditions optimales. Pour le même volume obtenu, deux réacteurs de laboratoire ayant des diamètres différents ont été conçus. Des essais ont été menés sur les deux réacteurs afin d'étudier les effets de plusieurs paramètres (débit d'alimentation, concentration en colorant et stabilité du bioréacteur) sur le rendement de dégradation. Une décoloration totale obtenue dans le cas de bioréacteur de diamètre de 3.5cm pour un débit d'alimentation de 100 mL/h et une concentration en colorant de 100 mg/L pour une durée de fonctionnement de 12 jours. Donc les dimensions du bioréacteur ont un effet direct sur la transformation et l'élimination du colorant azoïque RC, plus le rapport hauteur/diamètre est plus élevé, plus le bioréacteur sera plus efficace. Cette étude a montré la faisabilité du procédé continu dans la dégradation des colorants synthétiques dans les bioréacteurs à lit fixe garnis par la peroxydase immobilisée par inclusion dans l'alginate de calcium qu'il peut donner un succès significatif dans leur extrapolation à grande échelle dans le traitement des eaux polluées par les colorants azoïques.

La dégradation des colorants azoïques par des procédés biologiques en utilisant des enzymes peut engendrer des intermédiaires réactionnels pouvant être plus toxiques que la molécule initiale. Par conséquent, nous avons essayé de déterminer et de suivre la toxicité potentielle du colorant RC étudié et de ses intermédiaires générés au cours du traitement. On peut dire que La réduction de la toxicité

après traitement enzymatique par la peroxydase a été confirmée par l'étude de phytotoxicité des graines de fèves *Vicia faba*.

Compte tenu de ces résultats, on peut dire que le procédé enzymatique s'est révélé efficace pour la dégradation des colorants textiles. En effet, même s'il reste encore de la matière organique à la fin du traitement, cette dernière existe sous forme insoluble et non toxique. Dans cette étude, il a été possible pour des solutions de colorants du RC très chargés et par un traitement enzymatique dans un bioréacteur à lit fixe de réduire totalement et efficacement la couleur, de récupérer des substances valorisables, d'identifier de nouvelles voies de valorisation des produits obtenus après traitement enzymatique tout en réduisant très significativement la pollution engendrée par ces rejets.

En perspectives le présent travail a permis d'éclaircir les idées sur la possibilité d'utilisation des bioréacteurs à lit fixe dans la dégradation des colorants azoïques qui existent dans les effluents industriels par la peroxydase du navet immobilisée par inclusion dans les billes d'alginates de calcium. Il est donc intéressent de poursuivre l'étude en traitant les points suivants :

- Traitement des effluents réels issus des industries textiles chargés par les colorants azoïques.
- Extrapolation de ce procédé à l'échelle industrielle.
- Utilisation d'autres supports d'immobilisation pour minimiser les limitations difusionnelles.
- Augmentation du rendement de décoloration pour des concentrations et débits très élevés soit par un recyclage de la solution ou soit par utilisation de plusieurs bioréacteurs en cascade.

Ces quelques perspectives méritent bien évidemment d'être complétées, mais permettent néanmoins d'apprécier à quel point l'élucidation des mécanismes et des cinétiques de biodégradation des colorants azoïques par voie enzymatique a été dans ce travail, et reste encore avec une superficie importante, un formidable terrain de recherche.

Annexes

Annexe 1 : Courbes d'étalonnage et cinétique enzymatique

A-1 Test standard de l'activité enzymatique de la peroxydase

Le test standard de dosage de l'activité enzymatique est réalisé selon la procédure suivante:

- Dans une fiole jaugée de 50 mL, on a introduit 1ml de H_2O_2 (0,1M), phénol (0,1M) et 4-Aminoantipyrine (0,01M) utilisé pour développer la couleur. Le volume est complété avec la solution tampon pH 6,0.
- Un volume de 4mL du mélange standard préparé auparavant est versé dans des tubes à essais. À t_0, la réaction est déclenchée immédiatement après l'injection de 0.2 mL de l'enzyme libre ou 20 billes de l'enzyme immobilisée.

A-2 Courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène

Pour pouvoir transférer le développement de couleur de chromogène de Quinoneimine en concentration, nous avons calculé le coefficient d'extinction en se basant sur la même réaction de détermination d'activité enzymatique. A l'aide d'une solution mère d' H_2O_2 de 30% on prépare une série des délutions (1, 2, 3, 4,5, 6, 7, 8, 10).10^{-5}M, les mélanges réactionnels préparés contenant les produits suivant :

• 1.8 mL de solution tampon pH 6.0

• 1mL d' H_2O_2 de différentes concentrations.

• 1mL de 4-Amino-antipyrine à 0.001M

• 1mL de phénol à 0.01M

On déclenche la réaction en ajoutant 0.2 mL d'extrait enzymatique aux mélanges réactionnels, on laisse les réactions pour se développer jusqu'à la stabilité (pendent 10 min). Ensuite on lit les absorbance à 517 nm. La courbe ainsi obtenue est la suivante (figure A-1)

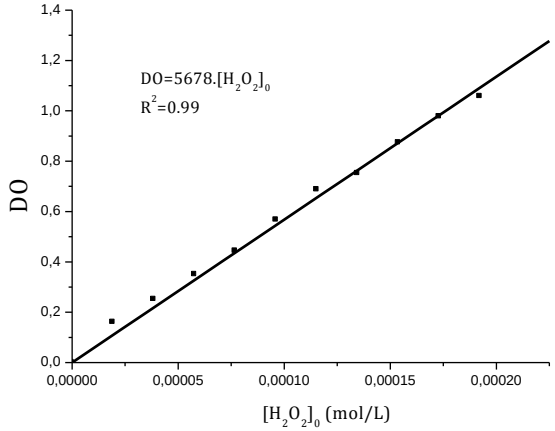


Figure A-1 : Courbe d'étalonnage de H_2O_2 (T_{amb}, pH 6.0, λ=517nm).

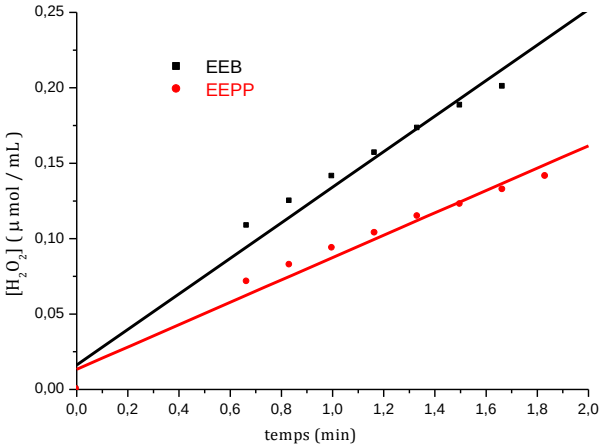


Figure A-2 : Cinétique enzymatique de l'EEB et l'EEPP (T_{amb}, pH 6.0, λ=517nm)

Annexe2 : Courbe d'étalonnage du rouge Congo

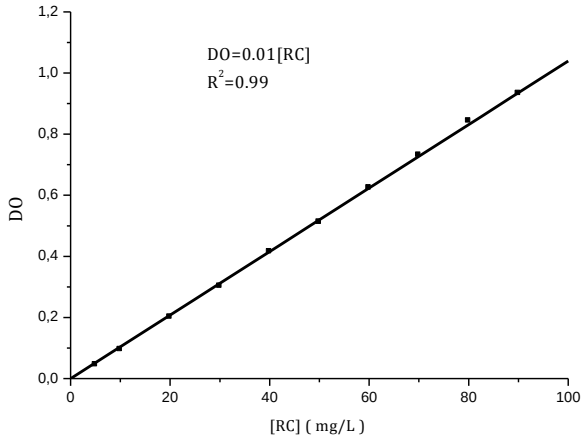


Figure A-3 : Courbe d'étalonnage de rouge Congo (λ= 500 nm)

Références bibliographiques

Références bibliographiques

[1] **Ben Mansour H., Mosrati R., Corroler D., Bariller D., Ghedira K., Bariller D., Chekir- Ghedira L.** In vitrostudy of DNA damage induced by acid orange 52 and its biodegradation derivatives. Environ. Toxicol. Chem 28:489-495 (2009).

[2] **Platzek T., Lang C., Grohmann G., Gi U.S., Baltes W.** Formation of a carcinogenic aromatic amine from an azo dye by human skin bacteria in vitro. Human Exp Toxicol 18:552–559 (1999).

[3] **Bauer C., Jacques P., Kalt A.** Photooxidation of an azo dye induced by visible light incident on the surface of TiO_2. J. Photochem. Photobiol. A Chem 140: 87-92 (2001).

[4] **Crini G. et Badot P.M.** Traitement et épuration des eaux industrielles polluées: procédés membranaires, bioadsorption et oxydation chimique. Presses Universitaire de Franche-Comté, (2007).

[5] **Henze M**., **Harremoes P**., **Arvin E. la Cour Jansen J.** Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes, Springer, Berlin, Germany. pp. 36–37 (2001).

[6] **Husain M. et Husain Q.**, Applications of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: a review. Crit Rev Env Sci Tec 38:1–41 (2008)

[7] **Valero E., Gonzalez-Sanchez M.I., Perez-Prior M.T**. Removal of Organic Pollutants from Industrial Wastewater by Treatment with Oxidoreductase Enzymes. Environment, Energy and Climate Change I. The Handbook of Environmental Chemistry 32: 317-339 (2015).

[8] **Husain Q. et Husain M**. Peroxidases as a Potential Tool for the Decolorization and Removal of Synthetic Dyes from Polluted Water. Environmental Protection Strategies for Sustainable Development. Strategies for Sustainability 453-498 (2012).

[9] **Ma J., Zhang L., Liang Z., Shan Y., Zhang Y.** Immobilized enzyme reactors in proteomics. Trends in Analytical Chemistry 30:691-702 (2011).

[10] **Medina-Moreno S.A., Perez-Cadena R., Jimenez-Gonzalez A., Tellez-Jurado A., Lucho-Constantino C.A**. Modeling wastewater biodecolorization with reactive blue 4 in fixed bed bioreactor by Trametes subectypus: Biokinetic, biosorption and transport. Bioresour Technol 123:452–462 (2012).

[11] **Gonzalez-Gutierrez L.V., Jimenez-Islas H., Eleazar M.** Escamilla-Silva. Dynamic transport and reaction model for azo dye removal in a UAFB reactor. Process Biochem 45 30–38 (2010).

[12] **Ventura-Camargo1 B.C., Marin-Morales M.A.** Azo Dyes : Characterization and Toxicity–A Review. Textiles and Light Industrial Science and Technology (TLIST) 2/2 85-113 (2013).

[13] **Singh K. et Arora S.** Removal of Synthetic Textile Dyes From Wastewaters: A Critical Review on Present Treatment Technologies. Cri Rev Env Sci Tec 41:807–878 (2011).

[14] http://www.universalis.fr/encyclopedie/colorants/

[15] **Jean-Jacques D**. Colorants textiles, Techniques de l'ingénieur, chimie organique, K 350.

[16] **SalpinF.** "laine et Colorants : fixation, quantification et vieillissement. Etude par spectrométrie Raman" thèse de doctorat ; Université pierre et marie curie ; (2008)

[17] **Maurice H.** E comme Additif, produits chimiques au menu, Edition Flammarion, 156p, (1988).

[18] **Capon M., Courilleu V., Valtte C.** Chimie des couleurs et des odeurs, culture et technique. Nantes ISBN (1999).

[19] **Breuer H**. Atlas de la chimie, Librairie Générale Française, (2000).

[20] **Guivarach, E.** "Traitement des polluants organiques en milieux aqueux par procédé électrochimique d'oxydation avancée "Electro-Fenton". Application à la minéralisation des colorants synthétiques", Thèse de doctorat de l'université de Marne-la-vallée, (2004).

[21] **Colour Index**. "Society of Dyers and Colourists and American Association of Textile Chemists and Colorists".4th edition. Bradford and Research Triangle Park, NC, (2002)

[22] **Kandelbauer A. et Guebitz G.M.** Bioremediation for the Decolorization of Textile Dyes – A Review, Part III, 269-288 (2003).

[23] **Sandhya S.** Biodegradation of Azo Dyes Under Anaerobic Conditions : Role of Azoreductase in Biodegradation of Azo Dyes (ed Atacag Erkurt H) Vol. 9, pp 39-57 (2010).

[24] **Zollinger H**. Colour chemistry: synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments, 5th edn. VCH Publishers, Weinheim, pp 187–246 (1991).

[25] **Hunger K., Mischke P., Rieper W., Raue R., Kunde K., Engel A.** Azo dyes. Weinheim: Wiley-VCH Verlag Allemagne (2005).

[26] **Chudgar R.J. et Oakes J.** "Dyes, Azo". In: Encyclopedia of Chemical Technology (**Othmer K**, Ed). John Wiley et Sons. 349-430 (2001).

[27] **Giles R. et Weaver M.** Nitrogen and/or sulfur containing heterocyclic azo dyes with aniline, tetrahydroquinoline and benzomorpholine couplers having sulfate group. Eastman Kodak Company, Rochester, New York (1981),

[28] **Delgado V. et Paredes-Lopez O.** Natural colorants for food and nutraceutical uses, Francisco (2002)

[29] **Griffiths A.** Substances aromatiques azoïques et à base de benzidine. Environnement, Santé Canada. (2012).

[30] **Øllgaard H., Frost L., Galster J., Hansen O.C.** Survey of azo-colorants in Denmark: Consumption, use, health and environmental aspects. Copenhague (Danemark): Ministry of Environment and Energy, Danish Environmental Protection Agency. Accès : (1998).

[31] Par collectif. Progrès en dermato-allergologie. John libbey. Eurotext, Paris Lyon, (1999).

[32] **Kandelbauer A. et Guebitz G.M.** Bioremediation for the Decolorization of Textile Dyes – A Review, Part III, 269-288 (2003).
[33] **Stellman J.M.** Encyclopédie de sécurité et de santé au travail, Vol 2. Bureau international du Travail, Genève. (2000).
[34] **Mohorcic M., Teodorovic S., Golob V., Friedrich J.**, Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths. Chemosphere; 63:1709–1717 (2006).
[35] **Aksu Z. et Tezer S.** Biosorption of reactive dyes on the green alga Chlorella Vulgaris. Process Biochem 40:1347–1361 (2005).
[36] **Vandevivere P.C., Bianchi R., Verstraete W.** Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies. J. Chem. Technol. Biotechnol.72:289-302 (1998).
[37] **Wang Y.** Solar photocatalytic Degradation of eight commercial dyes in TiO_2 suspension. Wat. Res. 34 : 990-994 (2000).
|38] Prévention de la pollution dans l'industrie textile dans la région méditerranéenne, Centre d'Activités Régionales pour la Production Propre (CAR/PP), Ministère de l'Environnement, Espagne (2002).
[39] **O'Neill C., Hawkes F.R., Hawkes D.L., Lourenco N.D., Pinheiro H.M., Delee W.** Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. J. Chem. Technol. Biotechnol., 74:10009–10018 (1999).
[40] **Ben Mansour H, O Boughzala v, Dridi D, Barillier D, Chekir-Ghedira L, Mosrati R**. Les colorants textiles sources de contamination de l'eau : Criblage de la toxicité et des méthodes de traitement. Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science, 24:209-238 (2011).
[41] **Gomes de Moreas S., Sanches F.S., Duran N.** Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. Chemosphere, 40:369 – 373 (2000).
[42] **Halcapek M., Jandera P., Prikryl J.** Analysis of sulphonated dyes and intermediates by electrospray mass spectrometry. Dyes Pigments. 43:127-137 (1999).
[43] **Storm T., Reemtoma T., Jekel M.J.** Use of volatile amines as ion-pairing agents for the high-performance liquide chromatographic-tandem mass spectrometric determination of aromatic sulfonates in industrial wastewater. Journal of Chromatography A, 854:175 –185 (1999).
[44] **Searly C.E.**, Chemical carcinogenesis (ACS Monograph N° 173). Washington : Americam Chemical Society (1976).
[45] **Kiriakidou F., Kondarides D.I., Verykios X.E.** The effect of operational parameters and TiO_2-doping on the photocatalytic degradation of azo dyes. Catal today 54/1:119-130 (1999).
[46] Décret exécutif n°06-141 du 20 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 19 avril 2006 définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels. Journal officiel de la republique algerienne N°26.
[47] **Orhon D., Sozen S., Gorgun E., Cokgor E., Artan N.** Technological aspects of wastewater management in coastal tourist areas. Water Sci Technol ; 39/8:177– 84 (1999).
[48] **Calin C. et Miron M.**, Future of the textile finishing industry in the year 2000. IndText (Bucharest); 46:140– 147(1995).
[49] **Hunger K.**, The organic pigments and their effects on toxicology and environment. Pitt Vernici Eur; 71: 2 –30 (1995).
[50] **Donmez G.**, Bioaccumulation of the reactive textile dyes by Candida tropicalis growing in molasses medium. Enzyme Microb Technol; 30:363– 366 (2002).
[51] **Mills C., Bull R.J., Cantor K.P.** Risques pour la santé liés à la consommation de sous-produits de la chloration de l'eau potable : rapport d'un groupe d'experts. Maladie Chron. Canada, 19/3 (1998).
[52] Santé Canada. Chloration de l'eau, votre santé et vous (1999).
[53] **Brown M.A. et Devito S.C.** Predicting azo dye toxicity. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 12 :405-414 (1993).
[54] **Rafii F., Hall J.D., Cernigalia C.E.** Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. Food Chem. Toxicol., 35:897-901(1997).
[55] **Bouafia S.** Dégradation des colorants textiles par procédés d'oxydation avancée basée sur la réaction de Fenton. Thèse de Doctorat, Université Paris-Est de France et Saâd Dahlab de Blida, (2010).
[56] **Sheng H.L. et Chi M.L.** Treatment of textile waste effluents by ozonation and chemical coagulation. Wat. Res. 27:1743-1748 (1993).
[57] **Kang S.F. et Chang H.M.** Coagulation of textile secondary effluents with fenton's reagent. Wat. Sci. Technol. 36/12; 215-222 (1997).
[58] **AL-Degs Y., Khraisheh M.A.M., Allen S.J., Ahmad M.N.** Effect of carbon surface chemistry on the removal of reactive dyes from textile effluent. Wat. Res. 34: 927-935 (2000).
[59] **Nicolet L. et Rott U.**, Recirculation of powdered activated carbon for the adsorption of dyes in municipal wastewater treatment plants. Wat. Sci. Technol. 40:121-198 (1999).
[60] **Lin S.H. et Lin C.M.**, Treatment of textile waste effluents by ozonation and chemical coagulation. Wat. Res. 7:1743-1749 (1993).
[61] **Weber E.J. et Adams, R.L.** Chemical-and sediment-mediated reduction of the azo dye disperse blue 79. Environ. Sci. Technol. 29:1163-1170 (1995).
[62] **Tang, W.Z. et Chen, R.Z.** Discolaration Kinetics and mechanisms of commercial dyes by H_2O_2/iron powder system. Chemosphere, 32: 947-958 (1996).
[63] **Liu R. et Tang H.** Oxydative decolorization of direct light red F3B dye at naturel manganese mineral surface. Wat. Res, 34: 4029-4035 (2000).
[64] **Deng N., Luo F., Wu F., Xiao M., Wu X.** Discoloration of aqueous reative dye solutions in UV/Fe system. Wat. Res. 34: 2408-2411 (2000).

[65] **Bousselmi L., Ghrabi A., Zayani G., Ghozzi K., Ennabli M., Geissen S.U., Weidemeyer A., Vogelpohl A., Bahnaman D., Hufschmidt D., Pichat P.** Solar Catalytic Treatment of Commercial Dyes., Wastewater and Environment Research 1:77-85 (2000).
[66] **Chun H., Wang Y., Tang H.** Preparation and characterization of surface bond-conjugated TiO_2/SiO_2 and photocatalytic of azo dyes. Appl catal B-Environ 30 : 277-285 (2001).
[67] **Zayani G., Bousselmi L., Ghrabi A., Ghozzi K.** Etude de la Cinétique de Dégradation photocatalytique du Colorant Commercial Azoïque (Jaune Cibacron FN-2R) ; Proceedings of International Symposium on Environmental Pollution Control and Waste Management 7-10 January 2002, Tunis, 838-845 (2002).
[68] **Hailei W., Ping L., Mina P., Zhijuna Z., Guanglib Y., Guoshengb L., Jianminga Y.** Rapid decolourization of azo dyes by a new isolated higher manganese peroxidase producer: *Phanerochaete sp.* HSD. Biochem Eng J., 46: 327–333 (2009).
[69] **Quintanilla-Guerrero F., Duarte-Vazquez M.A., G-Almendarez B.E., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R., Regalado C.** Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase Cuernavaca Morelos 62215, Mexico (2003).
[70] **Maria S., Guelli A., Souza U., Forgiarini E., Augusto A.** Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP); J Hazard Mater. 147:1073–1078 (2007).
[71] **Matto M. et Husain Q.** Decolorization of textile effluent by bitter gourd peroxidase immobilized on concanavalin A layered calcium alginate–starch beads; J Hazard Mater 164:1540–1546 (2009).
[72] **Alama Z., Mariatul F., Mansora K.C.A.** Optimization of decolorization of methylene blue by lignin peroxidase enzyme produced from sewage sludge with *Phanerocheate chrysosporium*; J Hazard Mater 162:708–715 (2009).
[73] **Ferreira-Leit V.S., Carvalho M.E., Elba P.S.** Lignin peroxidase efficiency for methylene blue decolouration: Comparison to reported methods; Dyes Pigments 74: 230-236 (2007).
[74] **Anjaneyulu Y., Sreedhara-Chary N., Samuel-Suman D.** Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 4:245–273 (2005).
[75] **Vandevivere P.C., Bianchi R., Verstraete W.** Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies. J. Chem. Technol. Biotechnol. 72:289-302 (1998).
[76] **Zhou M., He J.** Degradation of azo dye by three clean advanced oxidation processes: Wet oxidation, electrochemical oxidation and wet electrochemical oxidation—A comparative study**.** Electrochimica Acta. 53:1902-1910 (2007).
[77] **Lin S.H. et Peng C.F.** A continuous Fenton's process in treatment of textile wastewaters. Environ. Technol. 16: 693–699 (1995)
[78] **Adams C.D. et Grog S.** Effect of pH and gas-phase ozone concentration on the decolourization of common textile dyes. J. Environ. Eng. 128/3: 293–298 (2002).
[79] **Dulucq S. et Lancon B.** Oxydation des effluents de l'industrie textile ; MST Mesures et traitement des Pollutions et Nuisances, Option Eau, 1-13 (2004).
[80] **Omura T.** Design of chlorine – fast reactive dyes – part 4. Degradation of amino containing azo dyes by sodium hydrochlorite Dyes Pigments 26: 33–38 (1994).
[81] **Tanaka K., Padermpole K., Hisanaga T.** Photocatalytic Degradation of commercial azo dyes. Wat. Res. 34:327-333 (2000).
[82] **Dominguez J.R., Beltran J., Rodriguez O.** Vis and UV photocatalytic detoxification methods (using TiO_2, TiO_2/ H_2O_2, TiO_2/O_3, TiO_2/S_2O_8, O_3, H_2O_2, S_2O_8, Fe^{3+}/H_2O_2 and $Fe^{3+}/H_2O_2/C_2O_4$) for dyes treatment. Catalysis Today 101(3–4): 389–395 (2005).
[83] **Davis R.J., Gainer J.L., O'Neal G., Wu I.W.** Photocatalytic decolorization of wastewater dyes. Water Envion. Res. 66: 50–53 (1994).
[84] **Kim T.H., Park C., Lee J., Shin E.B., Kim S.** Pilot scale treatment of textile wastewater by combined processes (fluidized biofilm process – chemical coagulation – electrochemical oxidation). Water Res. 36:3979–3988 (2002).
[85] **Chen K.C., Wu J.Y., Liou D.J., Hwang S.C.J.** Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. J Biotechnol 101:57–68 (2003).
[86] **Sani R.K. et Banerjee U.C.** Decolorization of triphenylmethane dyes and textile dye-stuff effluent by Kurthia sp. Enzyme Microb Technol ; 24: 433– 437 (1999).
[87] **Yu J., Wang X.W., Yue P.L.** Optimal decolorization and kinetic modeling of synthetic dyes by *Pseudomonas strains*. Water Res 35: 3579– 8356 (2001).
[88] **Kanekar P. et Sarnaik S.** Microbial process for treatment. Sci Eng Toxic Hazard Substance Control A, 31:1035–1041 (1995).
[89] **Husain Q.**, Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. Crit Rev Biotechnol 60:201–221 (2006).
[90] **Valero E., Gonzalez-Sanchez M.I., Perez-Prior M.T.** Removal of Organic Pollutants from Industrial Wastewater by Treatment with Oxidoreductase Enzymes. Environment, Energy and Climate Change I. The Handbook of Environmental Chemistry. 32:317-339 (2015).
[91] **Moya R., Hernández M., García-Martín A.B., Ball A.S., Arias M.E.** Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. Bioresource Technol. 101:2224-2229 (2010).
[92] **Peralta-Zamora P., Pereira C.M, Tiburtius E.R.L., Moraes S.G, Rosa M.A., Minussi R.C., Durán N.** Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. Appl Catal B-Environ 42:131–144(2003).

[93] **Kalyuzhnyi S., Yemashova N., Federovich V.** Kinetics of Anaerobic Biodecolourisation of Azo Dyes, Water Sci. Technol. 54(2) :73-79 (2006).
[94] **Cheng X., Jia R., Li P., Tu S., Zhu Q., Tang W., Li X.** Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. Enzyme MicrobTech.41:258-264 (2007).
[95] **Singh S. et Pakshirajan K**. Enzyme activities and decolourization of single and mixed azo dyes by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Int. Biodeter. Biodegr. 64:146-150 (2010).
[96] **Boucherit N., Abouseoud M., Adour L**. Degradation of direct azo dye by *Cucurbita pepo* free and immobilized peroxidase. J Environ Sci. 25:1235-1244 (2013).
[97] **Karim Z., Adnan R., Husain Q**. A β-cyclodextrin–chitosan complex as the immobilization matrix for horseradish peroxidase and its application for the removal of azo dyes from textile effluent**.** Int. Biodeter. Biodegr. 72:10-17 (2012).
[98] **Omar H.H.** Algal Decolorization and Degradation of Monoazo and Diazo Dyes, Pak. J. Biol. Sci., 11/10:1310-1316 (2008).
[99] **Franciscon E., Zille A., Dias G.F., Ragaanin C., Menezes D., Durrant L.R., Cavaco-Paulo A.** Biodegradation of Textile Azo Dyes by a Facultative Staphylococcus Arlettae Strain VN-11 using a Sequential Microaerophilic/aerobic Process, Int. Biodeter. Biodegr.63 :280-288 (2009).
[100] **Galindo C.** Dégradation de colorants par la méthode d'oxydation avancée UV/H_2O_2. Thèse de doctorat, Université de Mulhouse, France. (1998).
[101] **Hao O.J., Kim H., Chiang P.C.** Decolorization of Wastewater, Crit Rev Env Sci Tec, 30:4, 449-505 (2000).
[102] **Michniewicz A., Ledakowicz S., Ullrich R., Hofrichter M.** Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccases from Cerrena unicolor. Dyes Pigments 77: 295–302 (2008).
[103] **Audigié C. et Zonszain F.** Biochimie métabolique ; Biosciences et techniques, Paris, (1995).
[104] **Augère B.** Les enzymes, biocatalyseurs protéiques, Ellipses, Paris ; (2001).
[105] **Tognolli M., Penel C., Greppin H., Simon P.** Analysis and expression of the large class III peroxidase gene family in Arabidopsis thaliana. Gene; 288:129–138 (2002).
[106] **Saunders B.C., Holmes-Siedle A.G., Stark B.P.** Peroxidase. Butterworks, London, p271, (1964).
[107] **Delannoy É., Marmey P., Penel C., Nicole M.** Les peroxydases végétales de classe III, Acta Bot Gallica 151/4: 353-380 (2004).
[108] **Regalado C., Garcia-Almendarcz B.E., Duarte-Vazquez M.A.** Biotechnological applications of peroxidases. Phytochem Rev 3:243–256 (2004).
[109] **O'Brien P.J.** Peroxidases. Chem-Biol Interact 129/1-2:113–139, (2000).
[110] **Veitch N.C.** Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. Phytochemistry 65:249-259 (2004).
[111] **Welinder K.G.** Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. Curr. Opin. Stru. Biol : 2: 388-393 (1992).
[112] **Passardi F., Bakalovic N., Teixeira F.K., Margis-Pinheiro M., Penel C., Dunand C.** Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. Genomics 89: 567–579 (2007).
[113] **Magri M.L., Miranda M.V., Cascone O.** Immobilization of soybean seed coat peroxidase on polyaniline: synthesis optimization and catalytic properties. Biocatal Biotransform 23: 339–346 (2005).
[114] **Torres E., Bustos-Jaimes I., Borgne S.** Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants Appl Catal B-Environ 46:1–15 Mexico (2003).
[115] **Ulson de Souza S.M.A.G, Forgiarini E., Ulson de Souza A.A.** Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). J. Hazard Mater, 147:1073–1078 (2007).
[116] **Azizi A., Abouseoud M., Ahmedi A.** Phenol removal by soluble and alginate entrapped turnip peroxidase. J Biochem Tech. 5/4:795-800 (2014).
[117] **Husain Q.** Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. Rev Environ Sci Biotechnol 9:117–140 (2010).
[118] **Bhunia A., Durani S., Wangikar P.P.** Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. Biotechnol Bioeng 72:562–567 (2001).
[119] **Duarte-Vazquez M.A, Ortega-Tovar M.A., Garcıa-Almendarez B.E., Regalado C.** Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (Brassica napus L. var. purple top white globe) peroxidase. J Chem Technol Biotechnol 78:42–47 (2002).
[120] **Kulshrestha Y. et Husain Q.** Decolorization and degradation of acid dyes mediated by partially purified turnip (Brassica rapa) peroxidase. Toxicol Environ Chem 89:255–267 (2007).
[121] **Matto M. et Husain Q**. Decolorization of direct dyes by salt fractionated turnip proteins enhanced in the presence ofhydrogen peroxide and redox mediators. Chemosphere 69/2: 338–345 (2007).
[122] **Husain Q. et Kulshrestha Y.** Removal of colored compounds from textile carpet industrial effluents by using immobilized turnip (Brassica rapa) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) peroxidases. Water Sci Technol (in press) (2009)
[123] **Shim J., Kim G.Y., Yeon K.H., Cho S.H., Woo J.J., Moon S.H.** Degradation of azo dye by an electroenzymatic method using horseradish peroxidase immobilized on porous support. Korean J Chem Eng 24:72–78 (2007)
[124] **Maddhinni V.L., Vurimindi H.B., Yerramilli A.** Degradation of azo dye with horse radish peroxidase (HRP) ; J.Indian Inst. Sci. 86:507-514 (2006).
[125] **Ulson de Souza S.M.A.G., Forgiarini E., Ulson de Souza A.A.** Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). J Hazard Mater 147:1073–1078 (2007).

[126] **Mohan S.V., Prasad K.K., Rao N.C., Sarma P.N.** Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase catalyzed process. Chemosphere 58:1097–1105 (2005)
[127] **Matto M. et Husain Q.** Redox mediated decolorization of Direct Red 23 and Direct Blue 80 catalyzed by bioaffinity based immobilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) peroxidases. Biotechnol J 3/8:1224–1231 (2008).
[128] **Knutson K., Kirzan S., Ragauskas A.** Enzymatic biobleaching of two recalcitrant paper dyes with horseradish and soybean peroxidase. Biotechnol Lett 27:753–758 (2005).
[129] **Satar R. et Husain Q.** Applications of Celite-adsorbed white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase in batch process and continuous reactor for the degradation ofreactive dyes. Biochem Eng J 46(2):96–104 (2009)
[130] **Satar R. et Husain Q.** Bitter gourd peroxidase-catalyzed degradation and decolorization of water insoluble disperse dyes mediated by 1-hydroxybenzotrialzole. Biotechnol Bioprocess Eng 14:213–219 (2009).
[131] **Akhtar S., Khan A.A., Husain Q.** Partially purified bitter gourd (Momordica charantia) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important dyes. Bioresour Technol 96:1804–1811 (2005).
[132] **Reginald H.G. et Grisham C.M.** Biochimie ; 2e édition américaine ; De Boeck université s.a. (2000).
[133] **Voet D. et Voet J.G.** Biochimie, 2e édition américaine ; De Boeck université s.a. ,(1998).
[134] **Moussard C.** Biochimie structurale et métabolique ; De Boeck et Larciers.a., (2006).
[135] **Combes D. et Monsan P.** Biocatalyse et catalyse enzymatique. Technique de l'ingénieur, Bioprocédés, BIO 590.
[136] **Kamoun P., Lavoine A. et Verneuil H.** Biochimie et biologie moléculaire ; Paris : Flammarion Médecine-Sciences, (2003).
[137] **Weil J.H.** Biochimie générale ; 10e édition, Dunod, Paris, (2001).
[138] **Cornish-Bowden A., Jamis M. et Saks V.** Cinétique enzymatique, EDP Sciences, 2005
[139] **Borel J.P. et Randoux A.** Biochimie dynamique ; De Boeck et Larciers.a., (1997).
[140] **Gordon F.B**. Immobilization of Enzymes and Cells. University of Paisley, Scotland, UK Humana. (1997).
[141] **Alloue W., Aguedo M., Destain J., Ghalfi H., Blecker C., Wathelet J.P., Thonart P.** Les lipases immobilisées et leurs applications ; Biotechnol. Agron ; Soc. Environ. 12(1), 57-68 (2008).
[142] **Guisan J.M.** Immobilization of enzymes and cells; Humana Press Inc ; Totowa, (2006).
[143] **Engasser J.M. et Horvath C.** Diffusion and kinetics with immobilized enzymes. In Applied biochemistry and bioengineering, vol. 1 Immobilized enzyme principles. (**Wingard L.B.** Ed) 127-220 (1976).
[144] **Al-Muftah A.E. et Abu-Reesh I.M.** Effects of internal mass transfer and product inhibition on a simulated immobilized enzyme-catalyzed reactor for lactose hydrolysis Biochem Eng Jl : 23/2 :139–153 (2005).
[145] **Riba J.P.** Réacteurs enzymatiques et fermenteurs. Techniques de l'ingénieur, traité de Génie des procédés, F3600-1.
[146] **Engasser J.M.** Factors influencing the performance of enzymic reactors. In enzymic and non-enzymic catalysis (Dunnill P, Wiseman A, Blakebrough N, Ed), 174-202, Ellis horwood (1980).
[147] **Lema J.M., Lopez C., Eibes G., Taboada-Puig R., M. Moreira T., Feijoo G.** Reactor Engineering. In Biocatalysis Based on Heme Peroxidases : Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts **(Torres E., Ayala M.,** Ed) Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2010).
[148] **Medina-Moreno S.A., Pérez-Cadena R., Jiménez-González A., Téllez-Jurado A., Lucho-Constantino C.A.** Modeling wastewater biodecolorization with reactive blue 4 in fixed bed biorea ctor by *Trametes subectypus*: Biokinetic, biosorption and transport**.** Bioresource Technol, 123:452-462 (2012).
[149] **Pitcher W.** Design and operation of immobilized enzyme reactors. In Advances in biochemical engineering (**Ghose T., Fiechter A., Blakebrough A.,** Ed). Springer, Berlin, (1978).
[150] **Lema J.M. et Roca E.** Bioreactors no conventionals. In Ingenierıa Bioquımica (**Godia F., Lopez J.,** Ed). Editorial Synthesis, Madrid (1998).
[151] **Carrara C.R., Mammarella E.J., Rubiolo A.C.** Prediction of the fixed-bed reactor behaviour using dispersion and plug-flow models with different kinetics for immobilized enzyme. Chem Eng J, 92:123-129 (2003).
[152] **Bodalo A., Gomez J.L., Gomez E., Hidalgo A.M., Gómez M., Yelo A.M.** Removal of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide in a discontinuous tank reactor. Desalination 195:51–59 (2006).
[153] **Cooper V.A. et Nicell J.A.** Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. Water Res 30:954–964 (1996).
[154] **Wang P., Woodward C.A., Kaufman E.N.** Poly (ethylene glycol)-modified ligninase enhances pentachlorophenol biodegradation in water-solvent mixtures. Biotechnol Bioeng 64:290–297(1999).
[155] **Mielgo I., Lopez C., Moreira M.T**., **Feijoo G., Lema J.M.** Oxidative degradation of azo dyes by manganese peroxidase under optimized conditions. Biotechnol Prog 19:325–331(2003).
[156] **Moreira M.T., Palma C., Mielgo I.,Feijoo G., Lema J.M.** In vitro degradation of a polymeric dye (Poly R-478) by manganese peroxidase. Biotechnol Bioeng 75:362–368 (2001).
[157] **Gomez J.L., Bodalo A., Gomez E., Hidalgo A.M., Gómez M., Murcia M.D.** A transient design model of a continuous tank reactor for removing phenol with immobilized soybean peroxidase and hydrogen peroxide. Chem Eng J 145:142–148 (2008).
[158] **Nicell J.A., Saadi K.W., Buchanan I.D.** Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidase enzyme and an additive. Bioresour Technol 54:5–16 (1995).
[159] **López C., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M.** Dye decolorization by manganese peroxidase in an enzymatic membrane bioreactor. Biotechnol Prog : 20/1:74-81 (2004).

Mis en forme : Police :Police de script complexe :+Titres CS, Français (France)

Mis en forme : Police :Police de script complexe :+Titres CS, Français (France)

Mis en forme : Police :Gras, Police de script complexe :+Titres CS, Gras, Français (France)

Mis en forme : Police :Police de script complexe :+Titres CS, Français (France)

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

[160] **Kim G.Y., Lee K.B., Cho S.H., Shim J., Moon S.H.** Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. J Hazard Mater 126:183–188(2005).
[161] **Georgiou D. et Aivasidis A.** Decoloration of textile wastewater by means of a fluidized-bed loop reactor and immobilized anaerobic bacteria. J Hazard Mater. B135 : 372–377 (2006).
[162] **Sen S. et Demirer G.N.** Anaerobic treatment of real textile wastewater with a fluidized bed reactor. Water Res 37 :1868–1878 (2003).
[163] **Wu J.Y., John H.S.C, Chenc C.T., Chen K.C.** Decolorization of azo dye in a FBR reactor using immobilized bacteria. Enzyme Microb Tech 37:102–112 (2005).
[164] **Shukla S.P. et Devi S.** Covalent coupling of peroxidase to a copolymer of acrylamide (AAm)-2-hydroxyethyl methaacrylate (HEMA) and its use in phenol oxidation. Process Biochem 40:147–154 (2005).
[165] **Rezvani F., Azargoshasb H., Jamialahmadi O., Hashemi-Najafabadi S., Mousavi S.M., Shojaosadati S.A.** Experimental study and CFD simulation of phenol removal by immobilization of soybean seed coat in a packed-bed bioreactor. Biochem Eng J, 101:32-43 (2015).
[166] **Mielgo I., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M.** A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). J Biotechnol 89 : 99–106 (2001).
[167] **Moldes D., Rodrıguez Couto S., Cameselle C., Sanroman M.A.** Study of the degradation of dyes by MnP of Phanerochaete chrysosporium produced in a fixed-bed bioreactor. Chemosphere 51:295–303 (2003).
[168] **Karim Z. et Husain Q.** Removal of benzidine from polluted water by soluble and immobilized peroxidase in batch processesand continuous horizontal bed reactor. Environ Technol 32/1:83–91 (2011).
[169] **Zhu G. et Wang P.** Novel interface-binding chloroperoxidase for interfacial epoxidation of styrene, J Biotechnol 117:195–202 (2005).
[170] **Zaks A. et Dodds D.R.** Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric oxidations: substrate specificity and mechanistic study. J Am Chem Soc 117:10419–10424 (1995).
[171] **Libby R.D., Thomas J.A., Kaiser L.W., Hager L.P.** Chloroperoxidase halogenation reactions. Chemical versus enzymic halogenating intermediates. J Biol Chem 257:5030–5037(1982).
[172] **Sasaki T., Kajino T., Li B., Sugiyama H., Takahashi H.** New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. Appl Environ Microbiol 67:2208–2212 (2001).
[173] **Wang P, Woodward C.A., Kaufman E.N.** Poly(ethylene glycol)-modified ligninase enhances pentachlorophenol biodegradation in water-solvent mixtures. Biotechnol Bioeng 64:290–297 (1999).
[174] **Akhtar S. et Husain Q**. Potential applications of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. Chemosphere 65:1228–1235(2006).
[175] **Horta A., Alvarez J.R, Luque S.** Analysis of the transient response of a CSTR containing immobilized enzyme particles. Part II. Minimum existence criterion and determination of substrate efective diffusivity and main reaction rate constant. Biochem Eng J 33:116–125(2007).
[176] **Buchanan I.D., Nicell J.A., Wagner M.** Reactor models for horseradish peroxidase catalyzed aromatic removal. J Environ Eng 124:794–802 (1998).
[177] **Wu Y., Taylor K.E., Biswas N., Bewtra J.K.** Kinetic model-aided reactor design for peroxidase catalyzed removal of phenol in the presence of polyethylene glycol. J Chem Technol Biotechnol 74:519–526 (1999).
[178] **Shukla S.P. et Devi S.** Covalent coupling of peroxidase to a copolymer of acrylamide (AAm)-2-hydroxyethyl methaacrylate (HEMA) and its use in phenol oxidation. Process Biochem 40:147–15 (2005).
[179] **Gomez J.L., Bodalo A., Gomez E., Hidalgo A.M., Gómez M., Murcia M.D.** Experimental behaviour and design model of a fluidized bed reactor with immobilized peroxidase for phenol removal. Chem Eng J 127:47–57 (2007).
[180] **Bayramoglu G. et ArIca M.Y.** Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. J Hazard Mater 156:148–155 (2008).
[181] **Cho S.H., Lee H.J., Moon S.H.** Integrated electroenzymatic and electrochemical treatment of petrochemical wastewater using a pilot scale membraneless system. Process Biochem 43:1371–1376 (2008).
[182] **Cho S.H., Shim J., Moon S.H.** Detoxification of simulated textile wastewater using a membraneless electrochemical reactor with immobilized peroxidase. J Hazard Mater 162:1014–1018 (2009).
[183] **Lee K., Gu M.B., Moon S.H.** Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by immobilized horseradish peroxidase and electrogenerated peroxide. Water Res 37:983–992 (2003).
[184] **Hendriks T., Wijsman H.J.W., Van loon L.** Petunia peroxidase: isolation, purification and characteristics. Eur. J. Biochem. *299:*139-146 (1991)
[185] **Liu J., Zhang Y., Qiu L., Ye L., Xia Y., Su Z.** A novel process of purifying soybean hull peroxidase. Chem. Biochem. Eng. Q. 19 (2) 199–205 (2005).
[186] **Penha H., Maciel F., Marli C., Gouvêa C.** Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *copaifera langsdorffii* leaves. Quim. Nova, 30:1067-1071(2007).
[187] **Rajendiran N. et Santhanalakshmi J.** Metal tetra sulfophthalo cyanines catalysed co-oxidation of phenol with 4-aminoantipyrine using hydrogen peroxide as oxidant in aqueous micro heterogeneous system. J Mol Catal A-Chem 245:185–191(2006).
[188] **Matto M. et Husain Q.** Decolorization of direct dyes by immobilized turnip peroxidase in batch and continuous processes. Ecotox Environ Safe. 72;965– 971 (2009).

Code de champ modifié
Code de champ modifié
Code de champ modifié
Code de champ modifié
Code de champ modifié
Code de champ modifié
Code de champ modifié

[189] **Fluka**, Chemika-Biochemika Analytika; Switzerland; 1995/1996
[190] **SchoreV.H.** traité de chimie organique,4e édition , (2001).
[191] **Sabnis R.W.** Handbook of acid-base indicators (RC), CRC Press by Taylor and Francis Group, LLC; (2008).
[192] **Baar D. et Lecomte M.** Rouge Congo ammoniacal, aqueux, SDS. Cercle des Mycologues du Luxembourg belge
[193] **Stellman J.M.** Chantal Dufresne. Encyclopédie de sécurité et de santé au travail, Volume 4, organisation internationale du travail ; (2000).
[194] **Purkait M.K., Maiti A., DasS., Gupta S.** Removal of Congo red using activated carbon and its regeneration. J Hazard Mater 145 ; 287-295 (2007).
[195] **Bernd H. et Rehm A.** Alginates: Biology and Applications, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2009).
[196] **Vitard J.** Manipulation Submicronique Interactive sous Différents Environnements de Microscopie. Thèse de doctorat, Université pierre et marie curie, France (2008).
[197] **Campbell P.N. et Smith A.D.** Biochimie illustrée, Maloine, Paris, (2006).
[198] **Vajihe Y. et Hamid-Reza K.** Statistical analysis for enzymatic decolorization of acid orange 7 by *Coprinus cinereus* peroxidase ; Int Biodeter Biodegr 64:245-252 (2010).
[199] **Pelmont J.** Enzymes. Alger : Office des publications universitaires, pp. 167 - 203, 217 – 240 (1993).
[200] **Chaplin M.** Enzyme inhibition. In enzyme technology. Cambridge University Press, pp. 6-7 (2002).
[201] **Palmer T.** Understanding enzymes. 2ème édition. Ellis Horwood Limited. pp.162 -163 (1985).
[202] **Jean C.** De la grappe au verre. Ellipses, Paris ; (2005).
[203] **Wang H., Li P., Pang M., Zhai Z., Yu G., Liu G., Yao J.** Rapid decolourization of azo dyes by a new isolated higher manganese peroxidase producer: *Phanerochaete* sp. HSD. Biochem Eng J 46:327–333 (2009).
[204] **Chatterjee S., Chatterjee S., Bishnu P., Guha K.** Adsorptive removal of Congo red, a carcinogenic textile dye by chitosan hydrobeads: Binding mechanism, equilibrium and kinetics. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 299:146–152 (2007).
[205] **Xudong L. et Rong J.** Decolorization and biosorption for Congo red by system rice hull- Schizophyllum sp. F17 under solid-state condition in a continous flow packed-bed bioreactor. Bioresource Technol 99:6885–6892 (2008).
[206] **Huayue Z., Ru J., Ling X., Yuhua C., Yujiang G., Xiaodong L., Guangming Z.** Photocatalytic decolorization and degradation of Congo Red on innovative crosslinked chitosan/nano-CdS composite catalyst under visible light irradiation. J Hazard Mater 169:933–940 (2009).
[207] **Chen B.Y, Chen S.Y, Chang J.S**. Immobilized cell fixed-bed bioreactor for wastewater decolorization. Process Biochem 40:3434–3440 (2005)
[208] **Karim Z. et Husain Q.** Removal of benzidine from polluted water by soluble and immobilized peroxidase in batch processes and continuous horizontal bed reactor. Environ Technol 32:83–91 (2011).
[209] **Satar R. et Husain Q.** Applications of Celite-adsorbed white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase in batch process and continuous reactor for the degradation of reactive dyes. Biochem Eng J 46 : 96–104 (2009).
[210] **Busignana P., et Cogrossi C.** Absorption IR du groupe -N=N- en colorants azoïques. Tetrahedron, 20:2361-2371. Pergamon Press Ltd, Printed in Northern Ireland (1964).
[211] **Le Fèvre R. S. W., O'Dwyer M. F., Werner R. L.** Chem. Et Ind. 378 (1953).
[212] **Luwerys R.** Toxicologie industriel et intoxication professionnelles, Masson, Paris ; (2003).
[213] **Derache R.** Toxicologie et sécurité des aliments, TEC. Apria, Paris ; (1986).
[214] **Viala A.** Eléments de toxicologie, Edition Médicales internationales, Lavoisier, TEC and Doc, (1998).
[215] **Truhaut R.** Toxicology and nutrition, Alfort, Paris, (1976).

Résumé : La décoloration enzymatique d'un colorant diazoïque, le rouge Congo (RC), par la peroxydase extraite à partir de navet "*Brassica rapa*" sous forme libre et immobilisée a été étudiée. La peroxydase du navet partiellement purifié a été immobilisée par inclusion dans les billes d'alginate de calcium et utilisée pour la décoloration d'une solution aqueuse de RC. Des essais expérimentaux en mode batch menés sous différentes conditions ont permis la détermination des conditions optimales sous lesquelles le rendement et la vitesse de dégradation sont les plus élevées. Pour les deux formes d'enzyme, libre et immobilisée, le pH et la température optimale étaient respectivement 2 et 40°C. Par ailleurs, dans le cas de l'enzyme libre, l'efficacité maximale a été obtenue à des concentrations en colorant RC de 50 mg/L, à 0.05 M en peroxyde d'hydrogène et en activité enzymatique (0.45 UI/mL) pour une durée de contact de 10 min. Cependant, dans le cas de la peroxydase immobilisée par inclusion dans l'alginate de calcium l'efficacité maximale a été enregistrée pour une concentration élevé en RC de 180mg/L et à une concentration plus faible de peroxyde d'hydrogène de 0.01 M. L'effet de certains produits chimiques sur le traitement du RC par la peroxydase partiellement purifiée a été également étudié. Plus de 97% et 94% de RC a été respectivement éliminé par la peroxydase libre et immobilisée après 1 h de traitement dans un procédé discontinu sous les conditions optimales de dégradation.

Les modèles cinétiques établis sur la base des résultats obtenus, ont été utilisés pour le calcul de bioréacteur de laboratoire, de type « lit fixe » contenant la peroxydase immobilisée pour le traitement en continu d'une solution aqueuse de RC. Dans cette étude, deux bioréacteurs de volumes égaux ont été réalisés avec des dimensions différentes. Le premier avec un diamètre de 3,5 cm et une hauteur de 40 cm a donné une efficacité d'élimination de plus de 96% pour un débit d'alimentation de 100 mL/h et pour une concentration du colorant de 100mg/L pendant une durée de fonctionnement continue de 12 jours. Le deuxième bioréacteur ayant des dimensions de 5cm de diamètre et 20 cm de hauteur était moins performant sous les mêmes conditions avec un rendement d'élimination de 87% du RC. L'analyse des sous-produits issue du traitement enzymatique par UV-Vis et spectroscopie IR montre l'absence des composés résiduels dans le surnageant et un précipité de nature polymérique. Les études de toxicité et de phytotoxicité ont révélé que les produits obtenus après la décoloration présentent moins de toxicité par rapport au colorant RC.

Mots clés : Azoïque, rendement ; décoloration, peroxydase, immobilisation, réacteur à lit fixe, toxicité.

Abstract: Enzymatic discoloration of the diazo dye, Congo red (CR), by free and immobilized plant peroxidase from turnip "*Brassica rapa*" is investigated. Partially purified turnip peroxidase (TP) was immobilized by entrapment in spherical particles of calcium alginate and was assayed for the discoloration of aqueous CR solution. Experimental tests of different parameters which were carried out in batch process allowed the determination of optimal conditions under which the highest yield and rate of degradation were obtained. The immobilized enzyme had the same optimal pH and temperature as the soluble enzyme which were at pH 2.0 and 40 °C. The optimal conditions for maximum efficiency using free peroxidase were at 50 mg/l CR dye, 0.05 M hydrogen peroxide, and TP activity of 0.45UI/ml within 10 min of incubation time. Whereas, the alginate entrapped turnip peroxidase gave the maximal color removal at high dye concentration of 180 mg/L and low hydrogen peroxide concentration of 0.01 M. The effect of some chemical products on the treatment of CR by partially turnip peroxidase was also studied. More than 97% and 94% of CR was removed by free and immobilized TP respectively after 1 h of incubation in a batch process under optimal conditions.

Kinetic parameters were also obtained for the peroxidase activity and were used for a fixed bed bioreactor design containing the entrapped peroxidase in calcium-alginate beads. In this study, two bioreactors were operated with different dimensions but at same volume. The first with a diameter of 3.5 cm and 40 cm height, retained more than 96% Congo red removal efficiency when working at a flow rate of 100mL/h, a concentration dye of 100 mg/L under continuous operating during 12 days. The second bioreactor with 5 cm diameter and 20 cm height was less performant. The elimination yield was estimated to 87% under the same conditions. Analysis of the by-products of the enzymatic treatment by UV-Vis and Infrared spectroscopy showed no residual compounds in the aqueous phase and a precipitate of polymeric nature. Toxicity and phytotoxicity studies revealed lesser toxicity of treated solutions when compared to original dye.

Key Words: Azo, yield, discoloration, peroxidase, immobilization; fixed bed reactor, toxicity.