République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Dr Yahia Fares de MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

Mémoire de Fin d'Etude pour l'obtention du diplôme en

Master en Génie des procédés

Option : Bioprocédés pharmaceutiques

Thème

Traitement enzymatique des colorants azoïques dans un réacteur à peroxydase immobilisée

<u>Proposé et dirigé par</u> :

- Pr. ABOUSEOUD Mahmoud
- M^{elle}. AHMEDI Afaf.

<u>Réalisé par</u> :

- M^{elle}. Abed Karima.
- M^{elle}. Chemam Aicha.

Année Universitaire : 2013-2014

REMERCIEMENTS

***T**out d'abord on rend grâce à **Allah**, le tout puissant qui nous a donné la santé et la volonté pour arriver à ce travail.*

***N**os Sincères remerciements vont à tous qui nous ont aidés de prés ou de loin à réaliser ce travail, spécialement :*

*Au terme de ce travail, Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur **ABOUSEOUD Mahmoud**, Professeur à l'Université de Médéa, qui nous a encadrés tout au long de ce travail. Son soutien, son enthousiasme et ses conseils avisés, à travers nos discussions, nous ont permis de mener à bien ce travail.*

*Il me tient particulièrement à cœur de remercier ma promotrice, **Mlle AHMEDI Afaf**, Maitre assistante à l'université de Médéa, pour toute l'attention qu'elle nous a accordée. Pour l'encadrement, les conseils, la disponibilité et la patience.*

***N**os remerciements iront de même à **Mr. NEDJIOUI** le chef de département de génie des procédés à l'université de Médéa.*

*Ce projet a été réalisé au niveau des laboratoires : contrôle qualité, et de fermentation du complexe **SAIDAL**, c'est avec un sentiment de profonde satisfaction que nous remercions : Monsieur **ABEDBELKACEMI**, pour l'accueil qu'il nous a accordé dans son laboratoire.*

*Et Cette étude a été réalisée aussi dans le laboratoire de Hall technologie de Médéa. Je suis très reconnaissante à Mr. **BOUDANA Djamel**, pour nous avoir accueillis dans le laboratoire.*

***N**ous exprimons nos profonds remerciements à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation.*

***N**ous tenons à remercier vivement tout le personnel du magasin de bibliothèque de l'université de Médéa, pour leur aide et leur disponibilité.*

***A**vec nos sincères gratitudes*

Dédicace

Je dédie ce travail :

A ma très chère mère

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon très chère père

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Aux fleurs de la maison les deux mes grands parents

A mes frères; **Fouad, Mohamed, Karim.**

A mes sœurs : F**atiha et sa marie, Nassima**, **Faiza**

Vous vous êtes dépensés pour moi sans conter. En reconnaissances de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

A la joie de la maison, mes neveux: **Zaki et Rimasse**

A l'espoir de la vie mon marie **Bilal** pour son aide et ses encouragements, et sa famille

A mes oncles, tantes, cousin et cousines (**Kamel**, **Samia**, **Naima**,….) affectueuses reconnaissances.

A mes enseignants de l'écoule primaire jusqu'à l'université dont les conseils précieux m'ont guidée; qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance. **A** ma binôme **Aicha** qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et à sa famille.

A mes amies; **Leila, Nabila, Khadîdja, Iman, Lamia, Chahra, Yacine, Wafa, Omar …** et à leurs familles.

Je vous remercie de votre patience vous m'a aidée toujours à avancer vous êtes tous des grandes amies si gentilles, merci d'être toujours près de moi, amies avec lesquelles je souris.

A toute la promotion de bioprocédés.

2012-2013

Karima

Dédicace



……A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour : mon père et ma mère.

A ma sœur Fatiha et mon frère Hamza qui m'ont toujours soutenu

A toute la famille Chemam

Ames chères amies : Karima, Hamida et Touba

Et avec toute la joie je le dédie à tous mes collègues de bioprocédés

2012-2013

Aicha

الملخص

يندرج هذا العمل في إطار دراسة فعالية و استعمال إنزيم البيروكسيداز النباتي المستخرج والمنقى من اللفت الأبيض"

براسيكا رابا "في التحلل البيولوجي لصبغة الأزوتي (أسود إريوكروم ت) في اثنين من المفاعلات الحيوية بالدعامة الثابتة بمختلف الأبعاد. حساب المفاعل الحيوي يعتمد على دراسة حركة التحليل البيولوجي للصبغ أسود اريوكروم ت بمختلف التراكيز للصبغ باستعمال إنزيم البيروكسيداز الحر والمثبت داخل ألجينات الكالسيوم.في هذه الدراسة:استطعنا أن نعرف الخصائص الحركية للتفاعل الإنزيمي كالسرعة القصوى و ثابت ميكيلز-منتن.

دراسة تأثير بعض العوامل كالتدفق, تركيز الملون واستمرارية الطريقة قد درست و تحصلنا على أن المفاعل الحيوي ذو القطر3.5سم و الارتفاع 21سم أعطى مردود إزالة الصبغة بنسبة 96% وقد تحقق مع معدل التدفق ب400ملل/سا وتركيز100مغ/ل أما بالنسبة للمفاعل الحيوي ذو القطر5سم والارتفاع 10.5سم فإن نتائج مردود إزالة الصبغة كانت 80% في نفس شروط العمل. استمرارية الطريقة برهنت بعد مدة 12 يوم إزالة أكثر من 72% من الصبغة بالنسبة للمفاعل الحيوي الأصغر قطرا أما المفاعل الحيوي الأخر فمردود إزالة الصبغة قد انخفض إلى 40%

الكلمات المفتاحية : صبغ أزوتي, بيروكسيداز، تثبيت ،مفاعل حيوي ،مردود إزالة اللون.

Résumé

Ce travail a pour objectif d'étudier l'efficacité de l'utilisation de l'enzyme peroxydase végétale extrait et purifié à partir du navet blanc "*Brassica rapa*" dans la biodégradation d'un colorant azoïque (Noir Eriochrome T) dans deux bioréacteurs à lit fixe à différents dimensions. Le calcul du bioréacteur se base sur une étude de la cinétique de biodégradation du noir ériochrome T à différentes concentrations du colorant en utilisant la peroxydase libre et immobilisée par inclusion dans l'alginate de calcium, lors de cette étude on a déterminé les paramètres cinétiques : la vitesse maximale et la constante de Michaelis-Menten.

L'effet de certains facteurs comme le débit, la concentration du colorant et la stabilité du bioréacteur ont été étudiés et on a trouvé que pour le bioréacteur de diamètre 3.5 cm et une hauteur de 21cm, une décoloration de 96 % est atteinte avec un débit de 400 mL/h et une concentration de 100mg/L; par ailleurs, pour le bioréacteur de diamètre 5 cm, et une hauteur de 10.5 cm le rendement de décoloration était 80% dans les mêmes conditions opératoires. Le test de stabilité a montré qu'après une durée de 12 jours une décoloration de plus de 72% pour le bioréacteur de diamètre le plus faible alors que pour l'autre bioréacteur le rendement de décoloration a diminué jusqu'à 40%

Mots clés : colorant azoïque, peroxydase, immobilisation, bioréacteur, rendement de décoloration.

Abstract

This Work aims to study the efficiency and use of the plant peroxydase enzyme, extracted and purified from white turnip "*Brassica rapa*" in the biodegradation of an azo dye (black ériochrome T) in two fixed bed bioreactors at different dimensions. Bioreactor design based on the study of biodegradation kinetic at different dye concentration, using the free and immobilized peroxydase by entrapment in calcium alginate. In this study, we determined the kinetic parameters: the maximum rate and Michaelis-Menten constant.

The effect of some factors such as flow rate, dye concentration and process continuity were studied and it was found that for the bioreactor of diameter 3.5cm and height of 21cm the discoloration of 96 % of dye was achieved with a flow rate of 400mL/h and a concentration of 100mg/L. However, for the bioreactor of diameter of 5cm and height 10.5 cm the yield of discoloration was 46% at the same operating conditions. Process continuity test showed after 12 days a discoloration of 72% for the less bioreactor diameter but for other bioreactor, the discoloration yield decreased at 40%.

Keywords: azo dye, peroxydase, immobilization, bioreactor, discoloration yield.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE: 31

Partie A : Synthèse bibliographique.

I. GENERALITE ET CARACTERISTIQUES DES COLORANTS :.....3

I.1.Introduction : 3

I.2.Définition et structure chimique des colorants : 3

I.3.Historique des colorants : 4**4**

I.4.Nomenclature des colorants :.....5**5**

I.5.Classification des colorants : 5

I.5.1.Classification chimiques : 5

I.5.2.Classification tinctoriale : **7**

II. LES COLORANTS AZOÏQUES :.....77

II.1.Définition et structure chimique : 77

II.2. Synthèse des colorants azoiques : 78

II.2.1.Diazotation :.....78

II.2.2. Couplage azoique : 78

II.3.Problèmes enviremmentalaux engendres par les colorants azoiqques :.....79

II.3.1. Dangers à court terme :.....79

II.3.2. Dangers à long terme :.....79

III. MEHODES DE TRAITEMENT DES EFFUENTS COLORES:.....710

III.1.Méthodes physiques: 710

III.1.1. Adsoption: 7**11**

III.2.Méthodes chimiques:.....711

III.2.1. Oxydation:.....711

III.2.2. Ozonation: 711

III.3.Methodes microbiologiques:.....712

III.3.1.Traitement aérobie:.....712

III.3.2. Traitement anaérobie:.....712

III.4. Méthodes enzymatiques:.....713

IV. GENERALITE SUR LES ENZYMES :.....14

IV.1. Introduction.....14

IV.2. définition.....14

IV.3. Caracteristiques des enzymes.....14

IV.4. Classification et nomenclature.....15

IV.4.1. Nomenclature 15

IV.4.2. Type de réaction catalysée 15

IV.5. Structure des enzymes 16

IV.5.1. Notion de site actif.....16

IV.5.2. Le consept de cinétique enzymatique 16

IV.6. Approche a la cinétique enzymatique.....17

IV.6.1. Modèle de base de la cinétique.....17

IV.6.2. Equation de Michaelis-Menten.....18

IV.6.3. Influence de la concentration de substrat sur la vitesse initiale 19

IV.7. Méthodes graphiques de determination de $K_M$et V_{max}.....20

IV.8. Unité de l'activité enzymatique 20
IV.9. Effecteurs de l'activite enzymatique 21
IV.9.1. Action d'agents physiques 21
IV.9.2. Action D'agents Chimiques 21
IV.10. Réactions a deux substrats 21
V.IMMOBILISATION DES ENZYMES : 2323
V.1.Introduction: 2323
V.2.Définition : 2323
V.3.Intéret de l'immobilisation : 2323
V.4.Téchniques d'immobilisation : 2424
V.4.1.Immobilisation par inclusion : 2324
V.4.2.Immobilisation par liaison à un support : 2424
V.4.3.Reticulation : 2626
V.5. Proprietes des enzymes immobilisees : 2626
V.5.1. Proprietes physico-chimiques : 2326
V.5.2. Propietes cinetiques : 2326
V.6.Choix du support : 2727
VI.LA PEROXYDASE : 2929
VI.1.Introduction : 2929
VI.2.Definition : 2929
VI.3.Classification : 3030
VI.4.Cycle catalytique de peroxydase : 3030
VI.5.Application industrielles de la peroxydase 3131
VII.GENERALITE SUR LE BIOREACTEUR: 3033
VII.1.Definition: 3033
VII.2. Principe de choix et de dimesionnement 3033
VII.3. Principaux types de bioreacteurs: 3033
VII.3.1. Réacteurs discontinus: 3034
VII.3.2.Réacteurs continus: 3035
VII.3.2.1.Bioreacteur a lit : 3035
VII.3.2.2. Réacteur a membrane: 3036
VII.3.2.3. Réacteur cellulaires a membranes planes : 3038
VII.4.Calcul du réacteur à lit fixe: 3038

Partie B: Matériels et méthodes:

VIII.PRODUITS, MATERIELS ET METHODES : 3041
VIII.1. Produits utilisés : 3041
VIII.1.1. Source de l'enzyme peroxydase : 3041
VIII.1.2. Substrats de la peroxydase : 3041
VIII.1.3. Solvants de purification : 3042
VIII.1.4. Produits utilisés dans le dosage des proteines : 3042
VIII.1.5. Produits utilisés dans l'immobilisation : 3042
VIII.1.6. Solutions tampons : 3042
VIII.2. Matériel utilisés : 3042
VIII.2.1. Equipement : 3042
VIII.2.2. Verrerie : 3042

VIII.2.3. Dispositifs exprerimentaux:.....3043
VIII.3. Méthodes expérementales:.....3044
VIII.3.1. Extraction de la peroxydase:.....3044
VIII.3.2. Purification de la peroxydase par l'acétone:.....3045
VIII.3.3. Dosage de l'activite enzymatique des extraits avant et aprés la purification:.....3047
VIII.3.4. Cinetique et effet de la concentration du NET sur la biodégradation du colorant avec la peroxydase libre :.....3048
VIII.3.5. Etude de degradation de colorant avec le paroxydase immobilisée :.....3049
VIII.3.5.1.Preparation des billes de la peroxydase immobilisée :.....3049
VIII.3.5.2.Caracterisation physico-chimiques des billes :.....3050
VIII.3.5.3.Cinetique en batch de la degradation du NET par la peroxydase immobilisée 30.....
51
VIII.3.6.Etude de degradation de colorant NET avec la peroxydase immobilisee dans deux bioreacteurs a lit fixe :.....3051
VIII.3.6.1.Etude l'effet de debit d'alimentation sur le rendement de decoloration: 3051
VIII.3.6.2.Etude de l'effet de la concentration du substrat (colorant) sur le rendement de décoloration :.....3052
VIII.3.6.3. La continuite du procédés :.....3052

Partie C: Résultats et Discussion:

IX. RESULTATS ET DISCUSSION :.....3053
IX.1. Extraction et purification de la peroxydase :.....3053
IX.1.1. Calcul de l'activité enzymatique pour les deux extraits:.....3053
IX.1.2. Dosage de la quantité de proteine :.....3053
IX.2.Cinétique et effet de la concentration du NET sur la biodégradation du colorant avec la peroxydase libre:.....3055
IX.2.1.Cinetique de degradation du colorant (NET) par la peroxydase libre :.....3055
IX.2.2.Effet de la concentration initiale du colorant sur le rendement et la vitesse de decoloration:.....3056
IX.2.3. Détermination des constantes cinetiques de la peroxydase libre :.....3058
IX.3. Cinétique et effet de la concentration du NET sur la biodegradation du colorant avec la 5peroxydase immobilisee :.....3059
IX.3.1. Caracterisation physico-chimique des billes d'alginate de la peroxydase :.....3059
IX.3.2. Cinétique de dégradation du NET par la peroxydase immobilisée:.....3059
IX.3.3. Effet de la concentration initiale du NET sur la vitesse initiale:.....3060
IX.3.4. Determination des constantes cinétiques de la peroxydase immobilisée :.....3061
IX.4. Etude de degradation de colorant NET avec la peroxydase immobilisée dans un bioréacteur a lit fixe :.....3062
IX.4.1. Dimensionnement du bioréacteur a lit fixe :.....3062
IX.4.2. Etude de l'effet de debit d'alimentation sur le rendement de décoloration :.....3062
IX.4.3. Effet de la concentration du substrat (colorant) sur le rendement de décoloration :3065
IX.4.4. Etude de la stabilite du bioréacteur.....3068

CONCLUSION GENERALE:.....3071
ANNEXE

Liste des figures

Partie A : Synthèse bibliographique.

Fig. I. 1: Structure moléculaire d'un colorant Anthraquinonique **6**
Fig. I. 2: Structure moléculaire d'un colorant phtalocyanine **6**
Fig. I. 3: Structure de l'indigo **6**
Fig. I. 4: Structure chimique d'un colorant nitré **7**
Fig. II. 1: Structure chimique générale des colorants azoïques **8**
Fig. II. 2: Synthèse des colorants azoïques **8**
Fig. II. 3: Conséquences de la bioaccumulation après déversement d'un colorant azoïque dans un cours d'eau **10**
Fig. IV. 1: Concept clé-serrure proposé par Emil Ficher pour expliquer la spécificité d'action des enzymes **16**
Fig. IV. 2: Illustration de mécanisme d'ajustement induite proposé par KOSHLAND **17**
Fig. IV. 3: Evolution de la concentration du substrat (S), produit (P), complexe (ES), et de l'enzyme (E) en fonction temps **17**
Fig. IV. 4: La relation entre la vitesse initiale et la concentration initiale du substrat **18**
Fig. IV. 5: Influence de la concentration de substrat sur la vitesse initiale **19**
Fig. IV. 6: Différents mécanismes de réactions enzymatiques deux substrats **22**
Fig. V. 1: Méthodes d'immobilisation des enzymes par inclusion **24**
Fig. V. 2: Fixation des enzymes à un support **24**
Fig. V. 3: Mode de fixation non covalente sur un support **25**
Fig. V. 4: Liaison covalente entre l'enzyme et le support **25**
Fig. V. 5: Réticulation des enzymes avec le glutaraldéhyde **26**
Fig. V. 6: Structure d'alginate G) : acide guluronique .M) : acide mannuronique **28**
Fig. V. 7: Mécanisme de formation d'un gel par interaction entre les ions calcium et l'alginate de sodium **28**
Fig. VI. 1: Structure chimique de l'hème de la peroxydase **29**
Fig. VI. 2: Structure de la peroxydase de Raifort (navet noir) **30**
Fig. VI. 3: Mécanisme réactionnel de la peroxydase **31**
Fig.VII. 1: Les deux formes de bioréacteurs agités (fermé et ouvert) avec l'enzyme immobilisée **34**
Fig.VII. 2: Construction de quelques types de bioréacteur à lit **35**
Fig.VII. 3: Réacteur enzymatique continu avec séparation et recyclage des biocatalyseurs par ultrafiltration **37**

Partie B : Matériels et méthodes:

Fig. VIII. 1: Dispositif de de purification la peroxydase par l'acétone **43**
Fig. VIII. 2: Dispositif d'un bioréacteur à lit fixe **44**
Fig. VIII. 3: Protocole de l'extraction de la peroxydase à partir du navet **45**
Fig. VIII. 4: Protocole de purification de la peroxydase par l'acétone **46**
Fig. VIII. 5: Réaction entre le phénol et la peroxydase de d'hydrogène en présence de 4- amino-antipyrine et la peroxydase **47**
Fig. VIII. 6: Protocole d'immobilisation de peroxydase dans l'alginate de sodium **50**

Partie C : Résultats et Discussion:

Fig. IX. 1: Activité enzymatique pour les deux extraits: EBB, EEPP.....**53**
Fig. IX. 2: Aspect des deux extraits : A) Extrait brut, B) Extrait enzymatique partiellement purifié par l'acétone **55**
Fig. IX. 3: Cinétique de décoloration de (NET) à différentes concentrations (pH=2, T=25°C, $[H_2O_2]_0$= 0.05M, AE= 0.217 UI/mL **56**
Fig. IX. 4: Effet de la concentration du NET sur le rendement et sur la vitesse de décoloration (pH=2, T=25°C, $[H_2O_2]$ =0.05M, [E]= 0.217 UI/mL, t=10min) **57**
Fig. IX. 5: Linéarisation de Lineweaver-Burk de la peroxydase libre **58**
Fig. IX. 6: Evaluation de la concentration de NETen fonction du temps (pH=2, T=25°C, $[H_2O_2]$=0.05M, [E]=0.028 UI/ bille **59**
Fig. IX. 7: Effet de la concentration initiale sur le rendement de décoloration du NET avec la peroxydase immobilisée (pH=2, T=25°C, $[H_2O_2]$=0.05M, t=10 min) **60**
Fig. IX. 8: Linéarisation de Lineweaver- Burk pour la peroxydase immobilisée **61**
Fig. IX. 9: variation de rendement et décoloration de NET en fonction du débit pour cinq fractions de 10 mL dans le bioréacteur de Ø=3.5 cm (NET=50 mg/L).....**63**
Fig. IX. 10: Variation du rendement du NETen fonction du débit pour cinq fraction de 10 mL dans le bioréacteur de Ø= 5 cm ([NET]= 50mg/L).....**63**
Fig. IX. 11: Effet de débit sur le rendement de décoloration duNETdans les deux bioréacteurs à lit fixe de dimensions différentes ([NET]=50mg/L) **64**
Fig. IX. 12: Variation du rendement de décoloration en fonction de la concentration duNET pour cinq fractions de 10 mL dans le bioréacteur de Ø=3.5 cm (D=400 mL/h**)** **65**
Fig. IX. 13: Variation de rendement de décoloration en fonction de la concentration du NET pour cinq fractions de 10 mL dans le bioréacteur de Ø= 5 cm (D=400mL/h) **66**
Fig. IX. 14: Aspect de l'eau de rinçage des bioréacteurs après chaque traitement dedécoloration **67**
Fig. IX. 15: Effet de la concentration du colorant sur le rendement de décoloration du NET dans les deux bioréacteurs à lit fixe de dimensions différentes (D= 400 mL/h) **67**
Fig. IX. 16: Variation du rendement de décoloration en fonction de temps pour cinq fractions de 10 mL dans le bioréacteur Ø=3.5 cm(D=400mL/h, [NET]=100mg/L) **68**
Fig. IX. 17: Variation du rendement de décoloration en fonction de temps pour cinq fractions de 10 mL dans le bioréacteur Ø=5cm (D=400mL/h, [NET]=100mg/L) **69**
Fig. IX.18: Effet du temps sur le rendement de décoloration du NET dans les deux bioréacteurs à lit fixe de dimensions différentes (D= 400 mL/h,[NET]=100mg/L).....**69**

Annexes:

Fig. A. 1: Mise en évidence de l'activité catalytique de la peroxydase dans le navet.
Fig. A. 2: Courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène.
Fig. A. 3: Courbe d'étalonnage de la protéine SAB suivant la méthode de Bradford.
Fig. A. 4: Courbe d'étalonnage du colorant NET.

Liste des tableaux

Partie A : Synthèse bibliographique.

T**ableau. IV.1:** Classification des enzymes selon la commission des enzymes de l'union internationale de biochimie 415
T**ableau. IV.2:** Representation de linearisation de l'equation de michaelis-menten selon les deferentes methodes 420
T**ableau. V.1:** Classification des supports d'immobilisation 427

Partie B: Matériels et méthodes:

T**ableau. VIII. 1 : C**aracterisation physico chimique de noir eriochrome T 441

Partie C: Résultats et discussion:

T**ableau.IX. 1:** Caracterisation des deux extraits avant et apres la purification 454

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
A	Activateur
DO	Densité optique
E	Enzyme
EEB	Extrait Enzymatique Brut
EEPP	Extrait Enzymatique Partiellement Purifié
HRP	Horse Radish Peroxydase (Peroxydase de Raifort)
I	Inhibiteur
LiP	Peroxydase de Lignine
MnP	Peroxydase de Manganèse
NET	Noir Eriochrome T
P	Produit
S	Substrat
SAB	Sérum d'Albumine Bovine

Nomenclature et symbole

Symbole	Signification	Unité
$[E]_t$	Concentration d'enzyme total.	(UI/mL)
$[S]_0$	concentration initiale du substrat.	(mg/mL)
K_i	Constant de vitesse.	-
R^2	Coefficient de corrélation.	-
ε	Porosité du garnissage du bioréacteur.	-
t	Temps.	(min)
T	Température.	(°C)
T_{opt}	Température optimal.	(°C)
pH_{opt}	pH optimal.	-
λ_{max}	Longueur d'onde correspondante à l'absorbance maximale.	(nm)
R	Rendement de décoloration.	%
V_0	Vitesse initiale de réaction.	(mg/L.min)
K	Constante catalytique.	(s^{-1})
K_M	Constante de Michaelis-Menten.	(mg/L)
V_{max}	Vitesse maximale de réaction.	(mg/L.min)
V_{moy}	Volume moyen des billes.	(cm^3)
m_{moy}	masse moyenne des billes.	(mg)
ρ_{moy}	masse volumique moyenne des billes.	(mg/mL)
D_{moy}	Diamètre moyen des billes.	(cm)
AE	Activité enzymatique.	(UI/mL)
Q	Débit d'élution.	(mL/h)

η	facteur d'efficacité du biocatalyseur.	-

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE :

Depuis 1856, lorsque le premier colorant synthétique a été signalé, l'utilisation des colorants dans les industries a augmenté de façon remarquable. Environ, un million tonnes des colorants synthétiques sont produits chaque année. La majorité de ces colorants synthétiques sont des dérivés azoïques. De nombreuses industries (textile, papeterie, plastique, agroalimentaire…) sont de gros consommateurs de colorants azoïques pour colorer leurs produits grâce à leur grande solubilité dans l'eau. Ces colorants synthétiques sont à la fois toxiques et responsables de la coloration des eaux. Il en résulte alors des eaux de rejets colorés qu'il est nécessaire de traiter avant leur rejet **[1]**.

Les réglementations en matière de rejets d'eaux usées sont également de plus en plus sévères et obligent les industriels à traiter leurs effluents. 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. Dans cette optique, plusieurs procédés de décoloration ont été utilisés entre autres l'adsorption sur différents types de supports solides, l'oxydation chimique, la floculation/coagulation, électrochimiques, photochimiques et les processus microbiologiques. Cependant, ces traitements ne sont pas toujours efficaces et se sont avérés soit insuffisants (limitation de leur capacité d'oxydation), soit trop onéreux (les polluants éliminés devraient subir encore d'autres traitements complémentaires comme l'incinération et/ou l'enfouissement), ce qui impose aux chercheurs de trouver un procédé de traitement alternatif moins coûteux et moins agressifs pour l'environnement **[1]**.

Durant les dernières années, de nombreuses études sur la dégradation enzymatique des colorants sont axées sur l'identification et la caractérisation des enzymes pouvant les dégrader. Les enzymes, grâce à leur pouvoir catalytique et surtout leur spécificité, prennent de jour en jour une position importante parmi les méthodes de traitement les plus efficaces du point de vue technico-économique pour le traitement de la pollution engendrée par les colorants**.** D'autre part, la technique d'immobilisation a permis de surmonter quelques contraintes liées à l'utilisation des enzymes tels que l'inhibition par le substrat, la réutilisation du biocatalyseur et sa stabilité dans les conditions physico-chimiques extrêmes **[2].**

A l'échelle industrielle il est nécessaire de construire un bioréacteur, le choix du type de bioréacteur effectué, son dimensionnement et son mode de conduite reposent sur la connaissance des vitesses des réactions biochimiques et de leur couplage avec les vitesses de

transfert de substrat. Pour le traitement d'eaux et d'effluents, les réacteurs à lit fixe sont les plus utilisés **[3]**.

Une des enzymes responsables de la dégradation des colorants est la peroxydase. Les peroxydases constituent un groupe important d'enzymes, largement répandu dans la nature, que ce soit dans les plantes (la source la plus commune est la racine de radis ou de raifort (radis noir), le navet...), les bactéries ou les animaux. Cette classe enzymatique utilise le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), pour oxyder des composés organiques, ce qui lui vaut son nom **[4].**

L'objectif de ce travail est de montrer l'efficacité de la peroxydase extraite d'une source végétale du navet "*Brassica rapa*" dans le traitement d'un colorant azoïque le "Noir Eriochrome T" dans un bioréacteur à lit fixe à peroxydase immobilisée. Dans ce contexte, notre étude est intéressée à trois parties essentielles :

La première partie A : une synthèse bibliographique qui rassemble :

- Les données essentielles sur les colorants azoïques, puis un aperçu sur les différentes méthodes de traitement des effluents colorés, principe, avantages et inconvénients, en particulier par voie enzymatique.
- En suite nous avons discuté les différentes caractéristiques des enzymes notamment la peroxydase,
- Puis quelque information sur le bioréacteur et les principes appliqués ainsi que ses applications à petite et à grande échelles.

La deuxième partie B : ou on a cité le matériel et les méthodes utilisés au cours de ce travail :

- Méthodes d'extraction et purification de la peroxydase.
- Dégradation du colorant NET par la peroxydase libre.
- Dégradation du colorant NET par la peroxydase immobilisée.
- Dégradation du colorant NET par la peroxydase immobilisée dans deux bioréacteurs à lit fixe à dimensions différents.

La troisième partie C : qui s'intéresse essentiellement à la discussion des résultats obtenus.

Enfin le mémoire se termine par une conclusion générale résumant l'essentiel du travail élaboré et les perspectives qui peuvent être envisagées dans le future.

Partie A :

Synthèse bibliographique.

I. LES COLORANTS :

I.1. Introduction :

Les substances colorantes servent à apporter à nous même et à notre environnement toute une panoplie de couleurs. Elles sont donc présentes tout autour de nous afin de stimuler et satisfaire nos désirs : textiles, tatouages et teintures capillaires, vêtements, aliments. Très tôt, les colorants naturels sont obtenus à partir d'extraits de plantes ou d'animaux, par exemple : du fruit, des fleurs, des racines et bien d'autres, mais leur synthèse n'a été réalisée qu'au vingtième siècle. Aujourd'hui, plus de 5000 colorants synthétiques ont été créés donnant ainsi naissance à une industrie de plusieurs milliards de dollars, ce qui constitue un marché économique considérable [**5**].

I.2. Définition et structure chimique des colorants :

Les colorants organiques sont essentiellement des molécules aromatiques qui se caractérisent par leur capacité à absorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible (380 à 700 nm). Les chimistes furent toujours intrigués par la relation entre la couleur et la constitution chimique des colorants. Dès 1868, Grèbe et Liebermann, connus pour leurs travaux sur la synthèse de l'alizarine, avaient déjà remarqué que les colorants étaient des composés chimiques insaturés. Mais, à ce sujet, la théorie la plus célèbre est celle établie par Witt en 1876, d'après laquelle la coloration est due à la présence dans la molécule de groupements **[5,6,7]** :

• **Chromogène** : C'est la structure aromatique qui peut être présentée par un : benzène, naphtalène ou bien un anthracène **[8].**

• **Chromophore** : C'est un groupe d'atomes, qui contrôle la couleur du colorant, reconnue par sa propriété de retirer les électrons. Il peut être représenté par les radicaux suivants **[1,8]** :

- Aso (-N=N-).
- Carbonyle (>C=O).
- Carbone- Nitrogène (C=NH ou -HC=N-).
- Nitrosé (-N=O ou N-OH) ou nitré (=NO_2- ou NO-OH).
- Sulfure (C=S).

• **Auxochrome** : C'est la partie influençant l'intensité de la coloration, ils sont des groupements stables appelés aussi groupement d'affinité car ils sont nécessaires pour

provoquer la solubilité et l'adhésion des colorants aux fibres. Ils peuvent être représentés par les groupements suivants **[1,6]** :

- Hydroxyle (-OH).
- Carboxyle (-COOH).
- Amin ($-NH_2$).
- Méthyle amine ($-NHCH_3$).
- Alcoyle (-OR).
- Diméthyle amine ($(-N(CH_3)_2$).
- Des radicaux sulfoniques et ces dérivés.

I.3. Historique des colorants :

Depuis le début de l'humanité, les colorants ont été appliqués dans pratiquement toutes les sphères de notre vie quotidienne pour la peinture et la teinture du papier, de la peau et des vêtements, etc. Jusqu'à la moitié du 19ème siècle, les colorants appliqués étaient d'origine naturelle. Des pigments inorganiques tels que l'oxyde de manganèse, l'hématite et l'encre étaient utilisés. Par ailleurs, des colorants naturels organiques ont été appliqués, surtout dans l'industrie textile **[9]**.

- **Les colorants naturels :**

Détenir la fin du 19éme siècle, les couleurs ne pouvaient être obtenues qu'à partir d'éléments naturels. Les premiers colorants connus sont ceux utilisés à Lascaux (France) ou à Altamira (Espagne), affinant du Magdalénien. Subsistes colorants étaient des pigments minéraux : oxydes de fer pour les jaunes, les ocres et les rouges, oxydes de manganèse pour les bruns. Dès 1500 avant notre ère, les Égyptiens réalisent des teintures avec le safran (jaune), le pastel (bleu) et la garance (rouge). Dès quand, la majorité des colorants utilisés sont d'origine végétale, extraits des plantes, des arbres ou des lichens, ou bien d'origine animale, ou des mollusques comme la pourpre. Mais le nombre de colorant naturels n'a jamais excédé quelques dizaines, alors que les colorants synthétiques comptent plus de sept mille exemplaires **[10]**.

- **Les colorants synthétiques :**

L'industrie des colorants synthétiques est née en 1856 quand le chimiste anglais William Henry Perkin, dans une tentative de synthèse de la quinine artificielle pour soigner la malaria, a obtenu la première matière colorante synthétique qu'il appela « mauve » (aniline, colorant basique). Perkin a breveté son invention et il a installé une chaîne de production, qui serait

bientôt suivie par d'autres. De nouveaux colorants synthétiques commencent à paraître sur le marché. Ce processus a été stimulé par la découverte de la structure moléculaire du benzène en 1865 par Kekulé. En conséquence, au début du 20ème siècle, les colorants synthétiques ont presque complètement supplantés les colorants naturels **[9].**

I.4. Nomenclature des colorants :

La dénomination des colorants commerciaux est loin de présenter la rigueur de celle-ci des composés chimiques, parce que, d'une part, ce ne sont ordinairement pas des produits purs et que d'autre part, les fabricants préfèrent très souvent ne pas en divulguer la constitution exacte. Cela a conduit, sous une inspiration poétique, à nommer les premiers colorants de noms de plantes (la mauvéine, la fuchsine, la garance, etc.) puis de noms de minerais (vert malachite, auramide, etc.). Par la suite, ils furent désignés selon leur constitution chimique (bleu de méthylène, noir d'aniline, vert naphtalène, etc.). Actuellement, chaque colorant est désigné par sa couleur, sa marque commerciale et un code qui permet d'insister sur une nuance (par exemple : R = rouge ; J, Y ou G = jaune ; B = bleu ; 2B = plus bleu, etc.) ou une qualité (L = solide à la lumière).

Afin de mettre un peu d'ordre, les associations britanniques Society of Ders and Coloristes (S.D.C.) et américaine American Association of Textile Chemisas and Coloristes (A.A.T.C.C.) ont édité le Coloured Index, dénombrant près des milliers de colorants synthétiques chimiquement différents et des dizaines de milliers de dénominations commerciales. Cet ouvrage tient lieu de référence en la matière, les colorants y sont classés selon leur structure chimique, leur usage (mode d'application, nuance) et leur désignation commerciale. Chaque colorant possède un numéro de référence qui désigne la classification tinctoriale (par exemple, C.I. [coloured index] Vat Blue 4, signifie qu'il s'agit d'un colorant de cuve bleu) **[11]**.

I.5. Classification des colorants :

Les principaux modes de classification des colorants reposent soit sur leur constitution chimique, soit sur leurs méthodes d'application aux différents substrats que sont les fibres textiles, le papier, le cuir, les matières plastiques, etc **[11].**

I.5.1. Classification chimique :

Le classement d'après la structure chimique s'appuie principalement sur la nature du Chromophore, qui constitue le squelette nécessaire à la coloration de la molécule ce qui amène à distinguer les principales familles suivantes **[5, 6,9]** :

- **Colorants azoïques** : Constituent la famille la plus importante sur le plan de l'application puis qu'ils représentent plus de 70% de la production mondiale de matières colorantes. Ils ont caractérisés par la présence du groupe azo (–N=N–) **[5].** (voir détail ultérieurement).
- **Anthraquinonique** : Sont du point de vue commercial, les plus importants après les colorants azoïques. Leur formule générale dérivée de l'anthracène montre que le chromophore est un noyau quinonique sur lequel peuvent s'attacher des groupes hydroxyles ou amino (Fig.I.1) **[6]**.

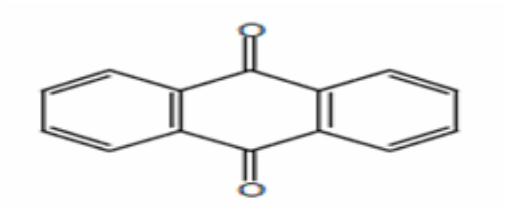


Fig.I. 1: structure moléculaire d'un colorant Anthraquinonique **[12]**.

- **Colorants phtalocyaniniques** : Ont une structure complexe basée sur l'atome central de cuivre (Fig.I.2) .Les colorants de ce groupe sont obtenus par réaction du dicyanobenzène en présence d'un halogénure métallique (Cu, Ni, Co, Pt,… etc.)**[6].**

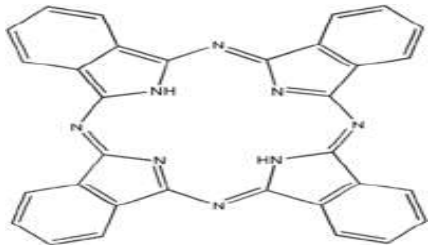


Fig. I. 2: structure moléculaire d'un colorant phtalocyanine **[12]**.

- **Colorants indigoïdes :** Un colorant indigoïde est celui dont la coloration est une variante de l'indigo (bleu-violet).Les colorants indigoïdes sont utilisés comme colorants textiles, comme additifs en produits pharmaceutiques en confiserie, ainsi que dans les diagnostics médecine. Le plus important des colorants indigoïdes est l'indigo lui-même, qui a la structure suivante (Fig.I.3) **[13].**

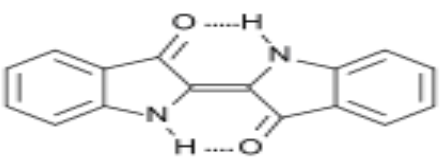


Fig. I. 3: Structure de l'indigo **[13]**.

- **Colorants nitrés et nitrosés** : Forment une classe des colorants très limitée en nombre et relativement ancienne. Ils sont actuellement encore utilisés, du fait de leur prix très modéré lié à la simplicité de leur structure moléculaire caractérisée par la présence d'un groupe nitro ($-NO_2$) en position ortho d'un groupement électro donneur (hydroxyle ou groupes aminés) (Fig.I.4) **[5,6]**.

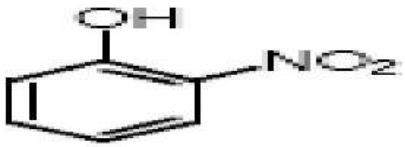


Fig. I. 4: Structure chimique d'un colorant nitré **[6]**.

I.5.2. Classification tinctoriale :

Si la classification chimique présente un intérêt pour le fabricant de matières colorantes, le teinturier préfère le classement par domaines d'application. Cette classification est basée sur la nature de groupement auxochrome présentant sur la molécule du colorant, qu'il renseigne sur la solubilité du colorant dans le bain de teinture, son affinité pour les diverses fibres et sur la nature de la fixation. Celle-ci est de force variable selon que la liaison colorant substrat est du type ionique, hydrogène, de Van der Waals ou covalente **[5].**

- *Colorants acides (anioniques).*
- *Colorants au soufre.*
- *Colorants cationiques.*
- *Colorants de cuve.*
- *Colorants directs.*
- *Colorants d'oxydation.*
- *Colorants réactifs.*

II. Les colorants azoïques :

II.1. Définition et structure chimique :

Les colorants "azoïques" sont caractérisés par le groupe fonctionnel azo (-N=N-) unissant deux groupements alkyles ou aryles Identiques ou non (azoïque symétrique et dissymétrique).Le groupe azo- peut être répété dans une même molécule : on a affaire à des colorants diazoïques, des tri-azoïques et plus généralement à des poly-azoïques (Fig.II.1).

Ils représentent plus de 70% de la production mondiale de matières colorantes, ces systèmes sont pseudo-aromatiques ou aromatiques comparé par une groupe Azo (–N=N–) **[14].**

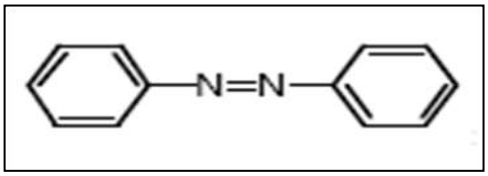


Fig. II. 1: Structure chimique générale des colorants azoïques **[15]**.

II.2. Synthèse des colorants azoïques :

La synthèse des colorants azoïques se fait généralement à deux stages comme illustré sur le schéma suivant (Fig. II.2).

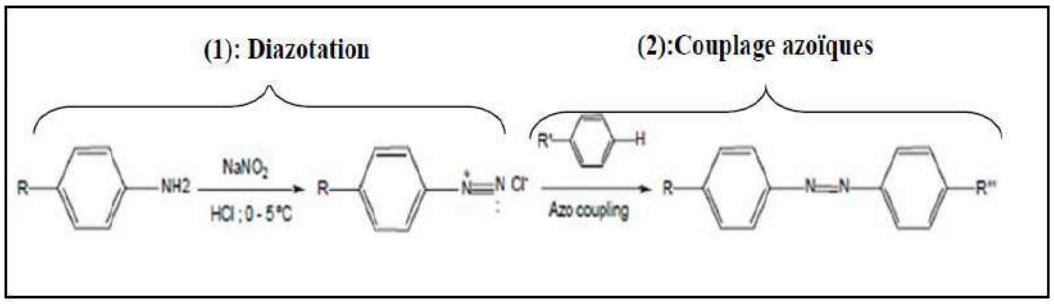


Fig. II. 2: synthèse des colorants azoïques [15].

II.2.1. Diazotation :

La diazotation, premier stage de synthèse des colorants azoïques, inclue le traitement d'une amine aromatique primaire (ArNH2) avec le nitrite de sodium dans un milieu acide sous une basse température pour former le sel de diasonuim (ArN2+ Cl-) (Fig. II.2)**.** L'acide le plus utilisé dans la diazotation est l'acide chlorhydrique et ça revient à la présence des ions chlorure (Cl^-) qui peuvent exercer un effet catalytique sur la réaction sous des conditions appropriées. Le solvant le plus utilisé pour la réaction est l'eau pour des raisons économiques et environnementales **[15,16].**

II.2.2. Couplage azoïque :

Le couplage azoïque est un exemple de substitution aromatique électrophilique dans lequel l'électrophile est le cation de diasonuim ArN_2^+(Fig.II.2).

Le cation de diasonuim est relativement un faible électrophile qui réagit seulement avec les systèmes aromatiques qui sont fortement activés à l'attaque électrophile par la présence d'une substance qui joue le rôle d'un donneur d'électrons. Ce donneur est généralement un groupement hydroxyle ou amino et ça montre que la plus part des composé qui sont capables d'avoir un couplage azoïques sont les phénols ou les amines aromatiques (primaire, secondaire, tertiaire) **[15, 16].**

II.3. Problèmes environnementaux engendrés par les colorants azoïques :

Grâce à leurs bonnes propriétés, les colorants azoïques sont utilisés par de nombreuses industries, ces industries consomment également de larges produits. La présence de quelques traces de colorants dans l'eau est fortement visible. Comme conséquence, une quantité considérable d'eaux usées colorées peut provoquer une toxicité écologique importante.

II.3.1. Dangers à court terme:

- **Eutrophisation** : Sous l'action des microorganismes, les colorants azoïques libèrent des nitrates et des phosphates dans le milieu naturel. Ces ions minéraux introduits en quantité très importante peuvent devenir toxiques pour la vie. Leur consommation par les plantes aquatiques accélère leur photosynthèse dans les strates les plus profondes des cours d'eau et des eaux stagnantes **[17].**
- **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. Manahat (1994) n'estime que la dégradation de 7 à 8 mg de matière organique par des micro-organismes Suffise pour consommer l'oxygène contenu dans un litre d'eau **[17].**
- **Couleur**, **turbidité**, **odeur** : L'accumulation des matières organiques dans les cours D'eau induit l'apparition de mauvais goûts, prolifération bactérienne, odeurs Pestilentielles et colorations anormales. Willamette et al. (1998) ont évalué qu'une Coloration pouvait être perçue par l'œil humain à partir d'une concentration de 5µg/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 **[17].**

II.3.2. Dangers à long terme :

- **La persistance:** Les colorants organiques synthétiques sont des composés impossibles à épurer par dégradations biologiques naturelles. Cette persistance est due principalement à leur réactivité chimique **[17].**

- **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 (fig. II.6.) **[17].**

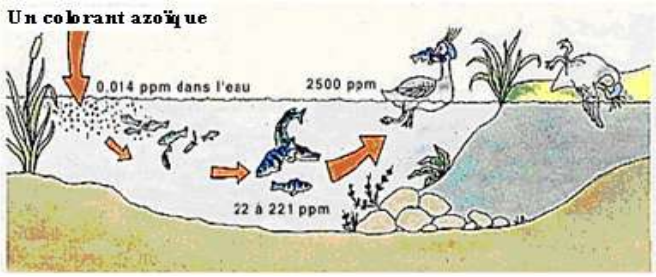


Fig. II. 3: Conséquences de la bioaccumulation après déversement d'un colorant azoïque dans un cours d'eau **[17].**

III. Méthodes de traitement des effluents colorés :

La majorité des techniques d'élimination des colorants sont basés soit sur l'entraînement des colorants sur des supports solides, ou par la destruction complète de la molécule du colorant (scission des liaisons C=C,-N=N-, et l'ouverture des arrangements hétérocycliques et aromatiques) **[2]**.Les Différentes méthodes ont été développées pour cette raison, ces méthodes peuvent être : Physique, chimique, biologique ou Enzymatique ou bien une combinaison de deux ou plus.

III.1. Méthodes physiques :

III.1.1. Adsorption :

L'adsorption est un processus de séparation au cours duquel des molécules d'un fluide (liquide ou gaz) viennent se fixer sur la surface d'un matériau solide, appelé adsorbant. L'adsorption résulte de deux mécanisme : l'adsorption et l'échange des ions et elle est Influencé par plusieurs paramètres physico-chimiques telle que les interactions colorant/adsorbant, la surface spécifique d'adsorbant, la taille des molécules du colorant, la température, le pH et le temps de contact **[1,18]**.Les adsorbants utilisés pour la décoloration des eaux sont différentié selon leurs natures, on distingue :

- ✓ Les supports organiques : sont caractérisés par leur bonne stabilité chimique et mécaniques et une grande surface spécifique ainsi une bonne résistance à la dégradation microbiologique. Parmi ces supports, en premier lieu on trouve le charbon actif **[19]**.
- ✓ Les supports inorganiques : ont certains avantages par rapport aux autres. Ils Proviennent généralement de sources renouvelables et sont des déchets ou des sous-produits de procédés industriels **[19]**.

Ce mode de traitement reste très limite pour l'élimination de tous les colorants du fait de la cherté du charbon actif. Seul les cationiques, coloration mordant, disperses ou dits de cuve et réactif sont éliminer par cette technique **[20]**.

III.1.2. Irradiation (la photo décomposition) :

Le traitement par radiation (la photo décomposition) est basé sur l'exposition des eaux colorées à des rayonnements qui ont des différentes longueurs d'onde pendant une durée déterminée. Pour procéder avec ce traitement, des quantités suffisantes d'oxygène sont exigées dans le milieu pour qu'une matière organique se décompose efficacement. Les rayons gamma sont parmi les rayons utilisés et qui donnent un bon résultat de décomposition en combinaison avec l'oxyde de titanisme. L'UV, le laser, sont tous des rayons Qui donnent une décoloration mais pour un type déterminé des colorants. La dégradation photo catalytique des colorants reste toujours limité car la plus part des colorants sont résistants a la lumière ainsi cette technique exige un matériel spécifique et consomme une énergie énorme **[1]**.

III.2. Méthodes chimiques:

III.2.1. Oxydation:

Elle est basée sur l'oxydation de l'arrangement aromatique de la molécule du colorant. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est l'un des agents les plus puissants et les plus utilisés. Son Action donnant le radical libre OH^- qui doit être activée par certaines sources, par exemple, la lumière ultraviolette. Ce procédé est limité vu que les colorants modernes présentent une certaine résistance à la lumière ultraviolette et à d'autres procédés de décoloration tel que UV/H_2O_2, UV/O_3, micro-ondes/ H_2O_2 **[1]**.

III.2.2. Ozonation :

L'utilisation de l'ozone a été lancée au début des années 1970. Il s'agit d'un très bon agent oxydant en raison de son instabilité élevée (E_0 = 2,07 V) par rapport à chlore (E_0 = 1,36 V) et H_2O_2 (E_0 = 1.78 V). Il peut oxyder sélectivement des liaisons non saturées (par exemple, -C=C- ou -N=N- et des structures aromatiques). L'oxydation par l'ozone conduit à la

dégradation des hydrocarbures chlorés, les phénols, les pesticides et les hydrocarbures Aromatiques.

Un majeur avantage de cette technique est que l'ozone peut être appliqué dans son état gazeux et donc n'augmente pas le volume des eaux usées et des bous mais en contre partie, il a une demi-vie courte, ce qui exige une application répétée et par conséquent un coût intensif de processus **[1,19]**.

III.3.Méthodes microbiologiques :

Grand nombre d'espèces ont été testées pour la décoloration et la minéralisation des colorants divers. Malheureusement, la majorité de ces composés sont chimiquement stable et résistant aux attaques microbiologiques. Le traitement microbiologique peut être aérobie ou anaérobie ou bien en combinaison de deux types et cela dépend de type des microorganismes utilisés pour le traitement **[1]**.

III.3.1.Traitement aérobie :

Dans une unité biologique constituée d'un bassin de boue activée, les polluants sont décomposés par des bactéries aérobies et autres microorganismes en une boue qui sédimente. Dans le cas idéal, les colorants sont oxydés jusqu'au dioxyde de carbone. Après Épuration, la boue est séparée des eaux usées par sédimentation dans un décanteur, une partie est recyclée et le surplus est évacué après pressage ou centrifugation **[1,6 ,19]**.

III.3.2.Traitement anaérobie :

A l'inverse de la biodégradation aérobie, la digestion anaérobie des composés organiques s'effectue en l'absence d'oxygène et forme du dioxyde de carbone, du méthane et de l'eau. C'est un procédé efficace pour le traitement de déchets très chargés en matières organique et le méthane formé peut être utilisé comme énergie de chauffage. Les conditions de réduction dans la digestion anaérobie sont adaptées à la décoloration des colorants azoïques par clivage de la liaison azo entraînant une destruction subséquente du groupe chromophore, mais une minéralisation complète est impossible dans ce type de procédé **[1,6, 19]**.

La dégradation des molécules initiales par ce procédé entraîne souvent la formation d'amines plus toxiques que la molécule initiale, qui finissent dans les sédiments aquifères peu profonds et les eaux souterraines. Les méthodes de bio-traitement conventionnelles sont sans effet sur la plupart des colorants synthétiques à cause de leur structure poly aromatique complexe et leur nature réfractaire. Venceslas et al. (1994) ont estimé à seulement 10-20 % la réduction de la coloration par les procédés biologiques **[17]**.

III.4. Méthodes enzymatiques :

Un grand nombre d'enzymes de différentes plantes et de microorganismes ont été rapportés à jouer un rôle important dans la décoloration des effluents. Contrairement aux Catalyseurs chimiques, les catalyses enzymatiques ont montré ses mérites pour convertir des structures chimiques compliqués sous des conditions douces sur l'environnement avec un rendement élevé. Comparant avec les autres voies, on trouve que l'utilisation des enzymes dans la dégradation des effluents chargés en colorants possède plusieurs avantages **[21]** :

- Les enzymes sont hautement sélectives et peuvent effectivement traiter les déchets puisqu'ils sont moins susceptibles d'être inhibés par des substances qui sont parfois toxiques pour les microorganismes vivants **[21]**.
- ils sont moins coûteux que les autres procédés s'ils sont produits en grande quantité **[20]**.
- Les catalyses enzymatiques ont montrés leurs mérites pour convertir des structures chimiques complexes dans des conditions douces sur l'environnement et avec une grande efficacité **[18]**.
- Les enzymes peuvent aussi agir sur certains polluants récalcitrants pour les éliminer par précipitation ou les transformer aux autres produits **[18]**.
- Ils peuvent également modifier les propriétés d'un effluent donné pour le rendre plus acceptable ou traitement **[18]**.
- Un grand potentiel dans le traitement d'un large spectre de composés colorées en les convertissant aux substances insolubles et moins toxiques qui peuvent être facilement enlevées **[14,22]**.

Beaucoup de chercheurs ont montrés que les enzymes oxydoréductases y compris la Peroxydase (peroxydase de lignine (LIP), de raifort (HRP), de manganèse (MNP)) et la Laccase sont impliqués dans la dégradation des colorants azoïques et synthétiques. Récemment, la peroxydase est la plus utilisé grâce à sa diversité et disponibilité, Bunia et Al. Ont montré que le HRP peut dégrader efficacement des colorants azoïques industriellement important comme le Romanov et l'acide Orange **[23]**.Dans les travaux antérieurs, les colorants directs, réactifs (en particulier les azoïques), trouvent une large application par traitements enzymatiques. La peroxydase extraite des racines de radis, conduit à un taux de décoloration de jaune direct 12, bleu de brome phénol et le méthyle orange de 70%, 100 % et 80% respectivement **[22]**.

IV. GENERALITE SUR LES ENZYMES :

IV.1. Introduction :

Les enzymes constituent la classe des protéines à la fois la plus vaste et la plus spécialisée. Ils sont sur le point de devenir des composants courants de nombreux processus industriels et de produits ménagers parce qu'elles permettent d'effectuer des réactions chimiques de manière très efficace et stéréospécifique et dans des conditions douces et particulières. D'autre part, les enzymes ne favorisent pas seulement une réaction chimique donnée, mais elles empêchent la présence des réactions secondaires gênantes. Au cours de ces dernies années ; le nombre d'enzymes connues a considérablement augmente et les applications sont multiples en biochimie analytique, en pharmacologie, en toxicologie, plus dans l'industrie agro-alimentaire **[24]**.

IV.2. Définition :

Les enzymes sont des protéines qui catalysent des réactions biologiques dans lesquelles un substrat est transformé en produit :

$$\text{Substrat(S)} \xrightarrow{(E)} \text{Produit (P)}$$

De point de vue structurale, on distingue des holoenzymes Constituent d'un complexe actif enzyme – cofacteur (aux-ci peuvent être disions métalliques tel que : Fe, Mg …ou organique tel que : le NAD, la biotine, coenzyme A…) et des apoenzymes présentent la partie protéique catalytique enzymatiquement inactive de l'holoenzyme **[25]**.

IV.3. Caractéristiques des enzymes :

Les enzymes son des catalyseurs biologiques qui différent des catalyseurs chimiques classiques sur quatre points importants **[26]** :

a. la vitesse de la réaction catalysée par ces biocatalyseurs est multipliée par des facteurs compris entre 10^6 et 10^{12} par rapport aux réactions non catalysées.
b. Les conditions de réaction enzymatiques sont plus douces, car les enzymes ont lieu à des températures dessous de 100°C, à pression atmosphérique et à pH proche de la neutralité.
c. Elles présentent une spécificité plus grandes vis à vis à leurs substrats et à leurs produits, ainsi les réactions ne donnent que rarement des produits secondaires.

d. L'activité catalytique de nombreuses enzymes varient en réponse au substrat autre que leurs substrats.

IV.4. Classification et Nomenclature :

IV.4.1.Nomenclature :

La commission des enzymes (enzyme commission) à établi une classification qui attribue à chaque enzyme un nombre à quatre chiffres (EC.X.X.X.X) en fonction **[27]** :

- De la réaction chimique.
- De la classe de la réaction.
- De la sous classe.
- De caractérisation de l'enzyme.

IV.4.2. Type de réaction catalysée :

En 1961 la commission des enzymes de l'union internationale de biochimie à établie une classification en six classes divisées en sous classes avec une nomenclature appropriée **[28]**.Le tableau ci dissous présente les grandes lignes :

Tableau. IV. 1: classification des enzymes selon la commission des enzymes de l'union Internationale de biochimie **[28].**

Classe	Type de réaction catalysée
➢ **Oxydoréductases**	Transfert d'électrons entre deux couples oxydoréducteurs.
➢ **Transférases**	Transfert d'un groupement chimique d'une molécule à autre.
➢ **Hydrolases**	La coupure de liaisons par hydrolase.
➢ **Lyases**	Clivage par élimination de liaisons et formation de double liaison.
➢ **Isomérases**	Changement de configuration d'une molécule.
➢ **Ligases**	La condensation de deux molécules par couplage avec la rupture d'une liaison à haut potentiel énergétique.

IV.5. Structure de l'enzyme :

La macromolécule enzymatique comporte de nombreux replis, qui ont notamment pour effet d'amener à proximité les uns des autre des groupement fonctionnels libres qui seraient mutuellement très éloigné si la macromolécule était en extension, certains de ces replis forment une cavité bien définie, appelée site actif de l'enzyme **[29]**.

IV.5.1. Notion du site actif :

On définit le site actif comme la région particulière de l'enzyme dans la quelle s'introduit le substrat et grâce à des liaisons faibles, il va transformer en produit. Le site actif est subdivisée en deux parties **[30] :**

- Site de fixation: il reconnait la complémentarité de forme avec un substrat spécifique à l'enzyme.
- Site catalytique : il permet la réaction de transformation de substrat en produit.

IV.5.2. Le concept du complexe enzyme-substrat :

La spécificité de la catalyse enzymatique est due à la nécessité, pour le substrat, d'avoir la forme convenable pour venir occuper le site actif.car l'enzyme engage le substrat dans un complexe, avant de catalyse toute réaction. La formation de ce dernier consiste aujourd'hui le concept central de catalyse enzymatique. Pour cela, il existe deux modèles **[29] :**

- **clé-serrure**: proposé par Emil Fisher, ce modèle pronostiqué la complémentarité stérique entre l'enzyme et son substrat.

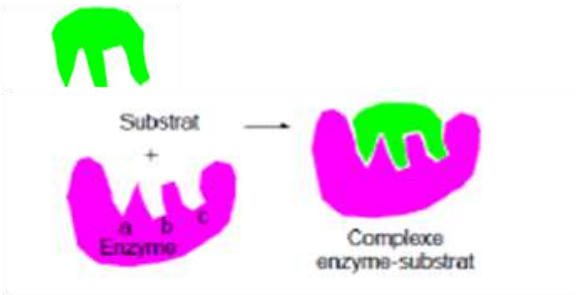


Fig. IV. 1: Concept clé-serrure proposé par Emil Ficher pour expliquer la spécificité d'action des enzymes **[27].**

- **La forme induite** : proposé par KOSHLAND, ce modèle implique que l'enzyme change sa conformation lors de la liaison du substrat.

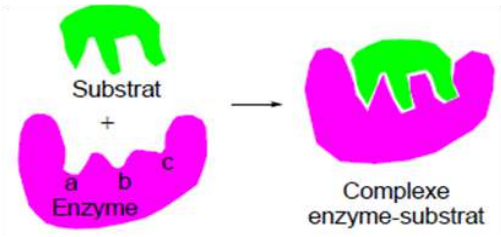


Fig. IV. 2: Illustration de mécanisme d'ajustement induite proposé par KOSHLAND **[27]**.

IV.6.Approche à la cinétique enzymatique :

La cinétique enzymatique étudie la vitesse des réactions enzymatiques, l'approche cinétique des réactions enzymatiques fournie des informations sur le mécanisme de la réaction, la spécificité de l'enzyme par rapport à son substrat, la présence éventuelle d'effecteurs ainsi que sur les propriétés physiques des enzymes. La cinétique enzymatique peut être suivre en mesurant la disparition du substrat ou on mesurant l'apparition du produit au cours du temps **[28].**

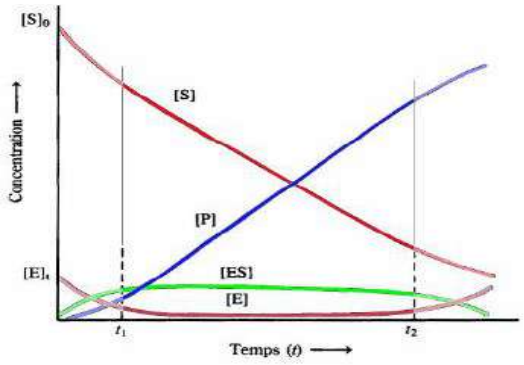


Fig. IV. 3: Evolution de la concentration du substrat (S), produit (P), complexe (ES), et de l'enzyme (E) en fonction temps **[28]**.

Où $[S]_0$ est la concentration initiale de substrat et $[E]_T$ la concentration totale d'enzyme ($[E]_0=[E] + [ES]$).

IV.6.1.Modèle de base de la cinétique :

En 1902 Victor Henry et Adrian Brown suggérèrent indépendamment que dans la réaction enzymatique, le modèle de base de la cinétique enzymatique s'écrit ainsi :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

L'hypothèse de fonction complexe E-S était nécessaire pour interpréter la forme hyperbolique de la courbe vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration de substrat **[26]**.

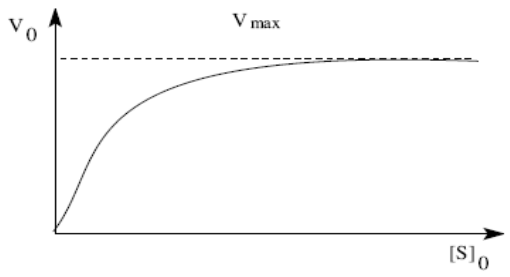


Fig. IV. 4: la relation entre la vitesse initiale et la concentration initiale du substrat **[26]**.

IV.6.2. Equation de Michaelis-Menten :

En 1913 Maud-Menten et Léonor Michaelis résolvent le système réactionnel en posant les hypothèses simplificatrices suivantes, suggérées par les études expérimentales **[31]** :

- la concentration de substrat $[S]_o$ est grande devant celle de l'enzyme $[E]_o$.
- la mesure de cinétique est toujours faite à des concentrations faibles $K_1 >>> K_2$.
- l'addition de l'enzyme est établie un équilibre rapide entre les formes libres et du substrat et les complexe enzyme-substrat (complexe de Michaelis).

Le schéma réactionnel s'écrit :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Dans ces conditions, la vitesse de la réaction devient :

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]_0}{K_M + [S]_0} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

Cette équation est appelé de Michaelis-Menten où:

V_{max} : vitesse maximale est atteinte lorsque tous les sites de l'enzyme sont saturés par le substrat. C'est-à-dire lorsque $[E]_0 = [ES]$.

K_M: est la concentration de substrat qui sature l'enzyme à moitié. C'est une mesure de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis le substrat: plus l'affinité est élevée, plus K_M est petit.

IV.6.3.Influence de la concentration de substrat sur la vitesse initiale :

L'étude de la cinétique enzymatique est réalisée par la mesure des réactions et analyse leurs variations en fonction des modifications du milieu (concentrations de substrat, pH, température, présence d'inhibiteurs ou d'activateurs).Lorsqu'on met l'enzyme en présence du substrat, on observe la formation du produit. La courbe qui représente la variation de la concentration du produit en fonction du temps permet de mesurer la vitesse initiale. On entend par vitesse initiale d'une réaction enzymatique la pente de la partie rectiligne de la courbe [P] = f(t), pratiquement, on mesure la tangente de la courbe expérimentale prés de l'origine du diagramme **[28,32]**.

On effectue une série de mesures de vitesses initiales en présence d'une concentration constante d'enzyme, mais en présence de la concentration variable de substrat, les différentes mesures portées sur un graphique $V_0=f[S]_0$ font apparaître une courbe d'allure différente. Cette courbe indique l'existence d'une vitesse maximale, V_{max} qui ne peut être dépassée, même en augmentant indéfiniment la concentration de substrat (Fig. IV.5) **[28].**

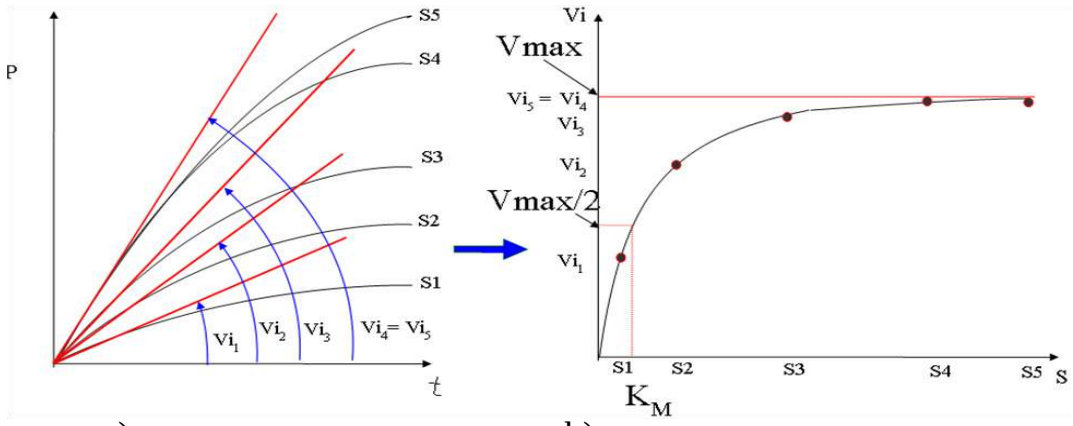


Fig. IV. 5: influence de la concentration de substrat sur la vitesse initiale **[28]**.

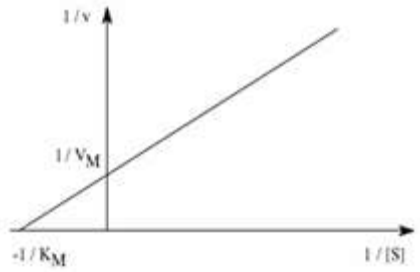
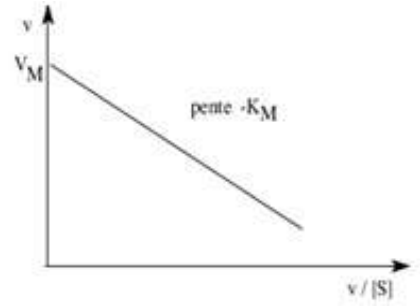
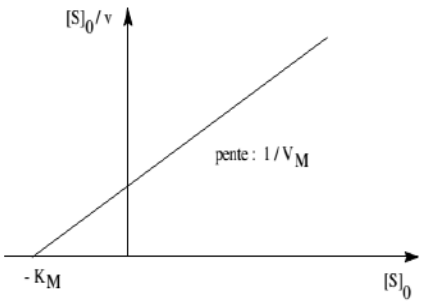
Figure A : Mesure de la vitesse initiale pour des concentrations différentes de substrat.

Figure B: Report des vitesses initiales en fonction de la concentration du substrat, qui permet de déterminer V_{max}. Par la suite, la concentration de substrat pour laquelle $V_0=V_{max}/2$ est numériquement égale à K_M **[28,32].**

IV.7. Méthodes graphiques de détermination K_M et V_{max} :

La détermination graphique directe de V_{max} et K_M n'est pas toujours précise, d'autres méthodes graphiques ont été proposées. Elles reposent sur une linéarisation de l'équation Michaelis-Menten.

Tableau. IV. 2: Représentation de linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten selon les déférentes méthodes **[28,33].**

Méthodes	Equation	Représentation graphiques
Lineweaver-Burk	$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}}\left(\frac{1}{[S]_0}\right) + \frac{1}{V_{max}}$ …… (2).	
Eadie-Hofstee	$V_0 = -K_M \frac{V_0}{[S]_0} + V_{max}$ …… (3).	
Hanes Woolf	$\frac{[S]_0}{v_M} = \frac{1}{v} * [s] + \frac{K_M}{v_M}$ …… (4).	

IV.8. Unité d'activité enzymatique :

La biochimie s'est aussi occupé de rendre compte de l'activité enzymatique en utilisant un formalisme commun pour l'ensemble des enzymes, il existe plusieurs façons d'exprimer l'activité d'une enzyme **[28,34] :**

- **Unité internationale d'activité enzymatique (UI)** : est la quantité d'enzyme catalysant la formation d'une micromole de substrat par minute dans les conditions expérimentales standards qui doivent être précisées (nature du substrat, température, pH,……etc.)
- **Unité officielle ; katal (kat)** : la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole de substrat par seconde ($1kal=1mole.s^{-1}$), en réalité cette unité est peu commandé car trop grande, les biochimistes utilisent alors le microkatal (10^{-6} kat), le nanokatal (10^{-9}), ou le picokatal (10^{-12}).
- **Activité spécifique**: On rapporte le nombre d'unités enzymatiques à la masse d'enzyme contenue dans le milieu réactionnel, on obtient l'activité spécifique en $kat.mg^{-1}$.
- **Activité molaire spécifique (absolue) :**c'est la quantité en mole de substrat transformée par unité de temps et par mole d'enzyme. Ainsi l'activité absolue de 200 molécules de substrats traitées par seconde constitue un ordre de grandeur moyen.

IV.9.Effecteurs de l'activité enzymatique :

IV.9.1. Actions d'agents physiques :

- **Influence de la température** : la réaction enzymatique a une vitesse globale augmente lorsque la température augmente (a composition constante) mais une augmentation de la température se traduit aussi par une dénaturation de l'enzyme et donc une baisse de l'activité catalytique, la compétition entre les deux effets se traduits par l'existence de la température optimale **[35]**.
- **Influence du pH** : il existe généralement aussi un pH optimal pour lequel la vitesse de la réaction enzymatique est maximale **[35]**.

IV.9.2.Actions d'agents chimiques :

Ces agents chimiques qui peuvent être minéraux ou organiques modifieront la vitesse de réaction enzymatique. Ils seront donc activateurs ou inhibiteurs **[33]** :

- **Activateurs enzymatiques** : Les activateurs sont en générale des effecteurs qui augmente l'activité enzymatique, ce sont des molécules ou des ions métalliques qui s'associent à l'enzyme ou complexe ES pour augmenter la vitesse de réaction enzymatique.
- **Inhibiteurs enzymatiques :** Les inhibiteurs sont effecteurs qui diminue l'activité enzymatique, les inhibitions agissent sur l'enzyme de façon réversible ou irréversible.

IV.10. Réaction à deux substrats :

Les réactions enzymatiques impliquant deux substrats et deux produits représentent 60%des réactions biochimiques connues. La théorie dans ce cas devient un peu plus

compliquée, Il faut en particulier distinguer différents mécanismes selon l'ordre de fixation et de largage des différents substrats et produits ; ou selon l'influence de la concentration d'un substrat sur V_{max} et K_M de l'autre substrat. Il y a deux classifications mécanistiques majeures **[29,36]** :

1) **Réactions séquentielles :** ou tous les substrats doivent combiner avec l'enzyme avant qu'il y ait transformation de substrat en produit. Ce type de réaction est connu sous le nom de réactions à déplacement simple **[36]**.

   Il y a deux sortes de réactions dans l'addition des substrats **[29]**.

   - **Mécanisme séquentiel au hasard :** Si les sites de fixation sont les deux accessibles à la surface de l'enzyme, l'ordre de fixation importe peu **[36]**.
   - **Mécanisme ordonné ou obligatoire :** Si le site actif de l'enzyme a la forme d'une poche, l'un des substrats doit pénétrer en premier **[36]**.

2) **Réactions ping-pong :** où un ou plusieurs produits sont libérés avant que tous les substrats aient participé dans la réaction. ces réactions connues sous le nom déplacement double impliquent une modification de l'enzyme et les deux substrats, A et B, ne se rencontrent pas sur la surface de l'enzyme **[36]**.

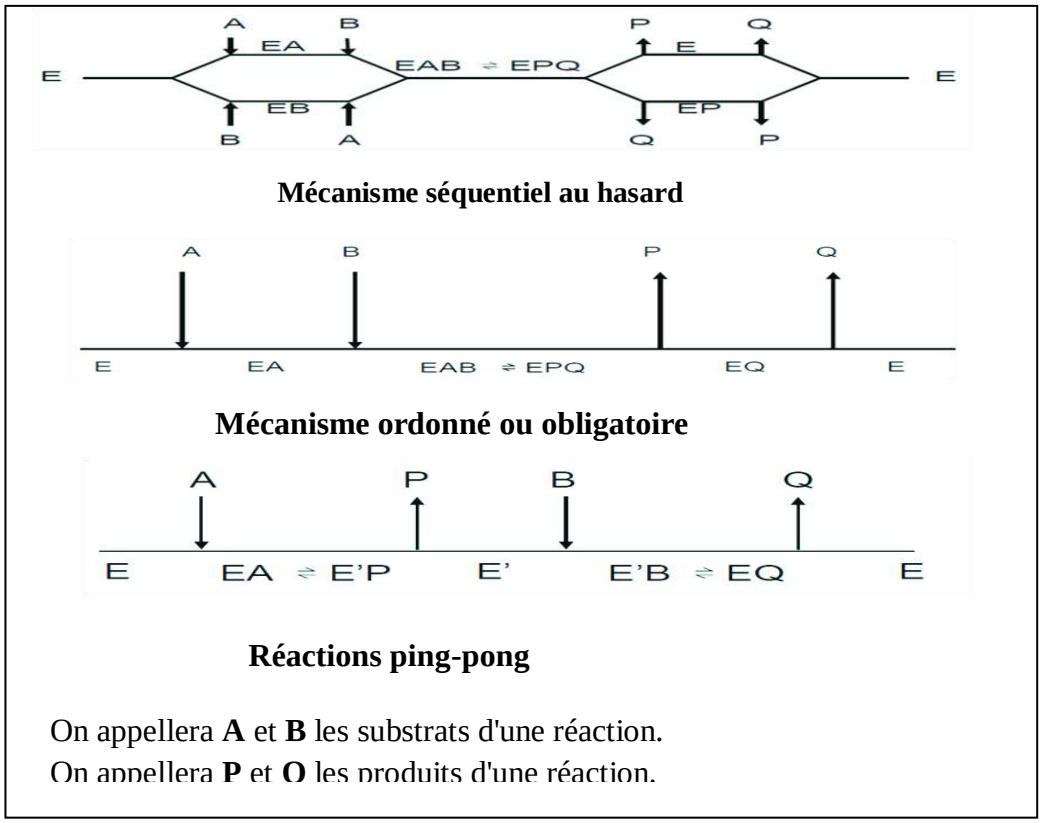


Fig. IV. 6: Différents mécanismes de réactions enzymatiques à deux substrats **[36].**

V. IMMOBILISATION DES ENZYMES :

V.1. Introduction :

L'utilisation d'enzyme est de plus employée dans les secteurs industriels du à leur facilité de production, de spécificité au substrat et sa limitation de formation de sous-produits. Cependant, pour la grande d'ampleur commerciale leur facteur de réutilisation devient obligatoire, échouant qu'elle ne serait plus économique. Ainsi l'entretient de leur stabilité structurale pendant n'importe quelle réaction biologique est fortement provocante.

En conséquence, les enzymes immobilisées avec l'efficacité fonctionnelle de la reproductibilité augmentent son exploitation comme solution de recherche dans les processus médicinaux et biotechnologiques **[37].**

V.2. Définition :

Les enzymes immobilisées sont des enzymes physiquement confinées ou localisées dans certaine région définie de l'espace avec la conservation de leurs activités catalytiques, et qui peut être utilisé à plusieurs reprises et sans interruption.

Plusieurs termes a été employée pour le définit : l'enzyme fixée, l'enzyme insoluble dans l'eau, l'enzyme piégée. Cependant le terme "enzyme immobilisée " a été recommandé pour la 1er fois en 1971 à la conférence de génie enzymatique **[38]**.

V.3. Intérêt de l'immobilisation :

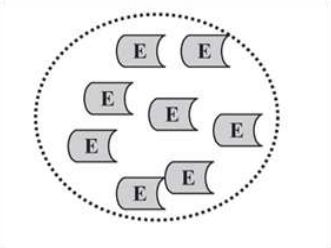
Les enzymes immobilisés offrent certaines propriétés opérationnelles plus que les enzymes ordinaires **[39,40]** :

- Utilisation multiple ou réitérée d'une série simple d'enzyme.
- La capacité d'arrêter la réaction rapidement en éliminant l'enzyme de milieu réactionnel.
- Le produit n'est pas contaminé avec le l'enzyme.
- Séparation simple d'enzyme du produit.
- Permet le développement d'un système de réaction multi-enzyme.
- réduit des problèmes de traitement des effluents.
- La stabilité d'enzyme à différentes pH et température, la reproductibilité plus la durée de la vie accrue.
- Les matériels d'immobilisation sont des matériels chimiquement inerte, insoluble et rendant insoluble d'enzyme (système biphasé-hétérogène).
- L'immobilisation offre certains effets protecteurs conte l'inactivation d'enzyme.

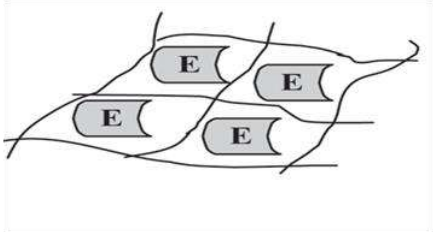
V.4.Techniques d'immobilisation :

V.4.1.Immobilisation par inclusion :

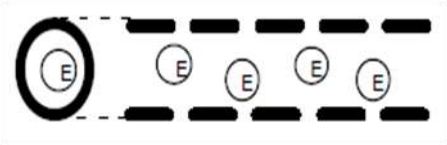
La méthode est basée sur l'occultation d'une enzyme dans le réseau d'un polymère insoluble dans L'eau, dans une fibre creuse, ou emprisonnées dans les microcapsules, éliminées par une membrane semi perméable qui permettre au substrat et au produit de passer mais le maintient l'enzyme **[38,41]**.



Ensymes encapsulées



Enzyme inclut dans un réseau



Enzyme retenue dans une fibre crue

Fig. V. 1: méthodes d'immobilisation des enzymes par inclusion **[24,38]**.

Ces procèdes d'immobilisation permettre de piéger fortement l'enzyme, mais elles sont limitées par la difficulté de transfert de masse par la membrane ou le gel. Ainsi les fuites d'enzyme à cause de la distribution large dans la taille de pores des gels synthétique **[38, 41]**.

V.4.2. Immobilisation par liaison à un support :

La fixation à un support est la technique d'immobilisation la plus ancienne .la quantité d'enzyme lié au support et l'activité après l'immobilisation dépend de la nature de support. Le schéma suivent indique comment l'enzyme se fixe sur un support **[39]**.

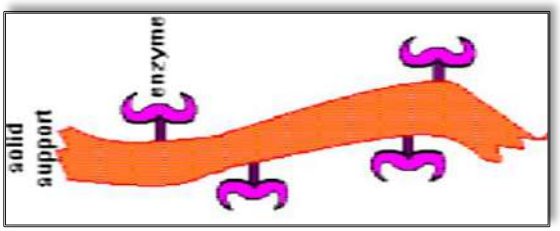
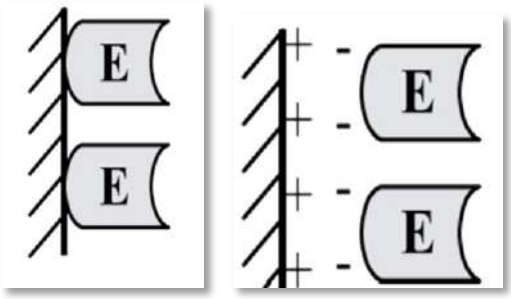


Fig. V. 2: Fixation des enzymes à un support **[39]**.

La sélectivité du support dépend de la nature de l'enzyme lui même ainsi la taille de la particule du support, de la surface de contact et de la composition chimique. La fixation d'enzyme sur le support peut être réalisée par différentes manières **[39,42]** :

- **Adsorption :** la fixation est réalisée grâce aux interactions secondaires (van der Waals, liaison hydrogène) qui s'établissent entre l'enzyme et la surface de la matrice. en revanche, la fixation est réversible non spécifique, ainsi le changement de conformation de la biomolécule et sa dénaturation, plus le risque de désorption en raison de changement de température, de PH, et de liaisons ioniques **[41,43]**.
- **Fixation ionique :** la fixation est fondée sur l'attache ionique réversible de la partie enzymatique au support insoluble dans l'eau. Contenant les résidus d'échange des ions.la fixation est simple, mais elle cause des changements dans la conformation de l'enzyme et son site actif, ainsi il y a des fuites d'enzyme **[38, 39]**.



Adsorption Fixation ionique.

Fig. V. 3: mode de fixation non covalente sur un support **[38]**.

- **Liaison covalente :** la fixation covalente est basée sur l'adhésion irréversible de groupement fonctionnel réactif du support et la partie non-fonctionnel de l'enzyme. Cette méthode est relativement chère et compliquées dans les procédures qui sont impliquées ; en outre, les rendements d'activité peuvent être bas du à l'exposition de l'enzyme aux environnements durs ou au réactifs toxiques **[39]**.

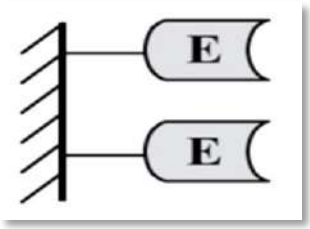


Fig. V. 4: liaison covalente entre l'enzyme et le support **[38].**

V.4.3. Réticulation :

L'immobilisation à été réalisé par la formation des liaisons covalentes intermoléculaires entre l'enzyme et une protéine de charge (Albumine, gélatine, …) en présence d'un agent bi ou multifonctionnel (glutaraldéhyde) **[41]**.

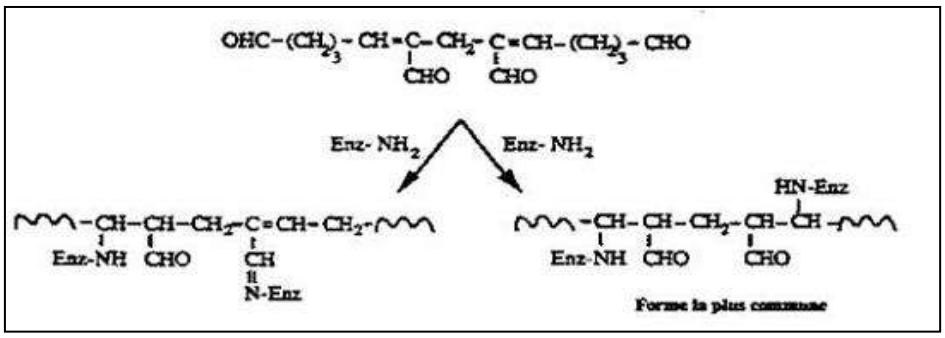


Fig. V. 5: réticulation des enzymes avec le glutaraldéhyde **[24]**.

Son principal avantage est la stabilité des enzymes adsorbés et la diminution des pertes à partir de gel formé ; en outre, la réticulation est chère et insuffisante, ainsi elle provoque en générale une diminution importante de l'activité enzymatique grâce à la présence d'agents de réticulation qui sont des inhibiteurs irréversibles **[41]**.

V.5. Propriétés des enzymes immobilisées :

L'immobilisation des enzymes conduit souvent à un changement de leurs propriétés physiques, chimiques, cinétiques.

V.5.1. Propriétés physico-chimiques : une des propriétés importantes est l'amélioration de la stabilité dans le temps et de la résistance vis-à-vis la dénaturation. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend beaucoup du microenvironnement imposé par le support **[24]**.

V.5.2. Propriétés cinétiques : 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'accès du substrat au niveau du site enzymatique. Ceci a pour conséquence une variation de la vitesse maximale V_{max} et de la constante de Michaelis K_M de l'enzyme ; cette dernière constante pouvant avoir une valeur 10 fois supérieure. De même, le pH de l'enzyme peut être modifié, en particulier lorsque la réaction enzymatique met en jeu une libération ou une consommation de protons **[24]**.

V.6.Choix du support :

Les caractéristiques du support ont une grande importance dans la détermination des performances des enzymes immobilisées. Un support idéal est celui qui possède les propriétés suivantes **[44]** :

- Résistance vis-à-vis les compressions physiques.
- Biocompatibilité.
- Inerte vis-à-vis l'enzyme.
- Resistance a l'attaque microbienne.
- Disponibilité avec des prix raisonnables.

Les supports peuvent être classés comme organique et inorganique selon leurs compositions chimique .les supports organiques sont aussi subdivisés en deux types : des polymères synthétiques et naturels **[44]**.

Tableau. V. 1: Classification des supports d'immobilisation [**38].**

Supports organiques.
♦ ***Les polymères naturels :*** • Polysaccharides : Cellulose, dextrines, Agar, agarose, la chitine, alginate. • Protéines : collagène, albumine. ♦ ***Les polymères synthétiques :*** • Polystyrène. • Autre polymères: polyacrylate, polyacrilamide, polyamides, polyvinyle.
Supports inorganiques.
♦ ***Les minéraux naturels :*** • bentonite, silice. ♦ ***Les matériaux traités.*** • Verre, métaux, les oxydes métalliques poreux.

➢ **Immobilisation des enzymes par inclusion dans l'alginate :**

L'alginate est un polysaccharide présent chez les algues brunes ou Phaeophyceae, sous forme d'un mélange de sel (sodium, potassium, calcium, magnésium) et d'acide alginique.

L'acide alginique est un polymère constitué de résidus d'acides α-L-guluronique et β-D mannuronique (Fig.V.6). L'alginate est principalement extrait à partir de Macro cystispyrifera. L'alginate est l'un des biopolymères le plus fréquemment utilisé pour l'immobilisation par inclusion non seulement grâce à ses propriétés de gélification mais aussi grâce à sa non-toxicité. La gélification qui est l'une des principales propriétés des alginates est due au fait qu'ils réagissent avec les cations divalents (sauf le magnésium) et précipitent lorsque ces cations sont en excès **[45]**.

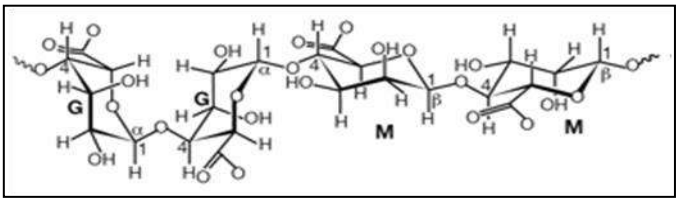


Fig. V. 6: structure d'alginate G) : acide guluronique .M) : acide mannuronique **[45]**.

Le calcium est le cation le plus utilisé car il est simple, disponible, et peu coûteux. Lorsque la solution de l'alginate de sodium est en contact avec une solution riche en cations Ca^{2+}, une structure semi-solide se forme immédiatement dans sa couche externe. Ensuite, les cations Ca^{2+} passe à travers la couche externe pour former la structure de gel pour l'ensemble d'alginate (Fig. V.7) **[46]**.

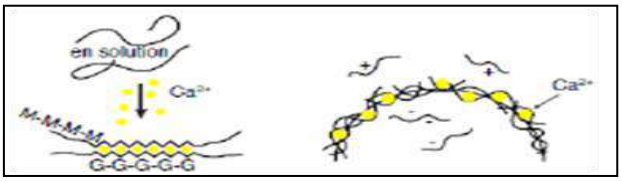


Fig. V. 7: Mécanisme de formation d'un gel par interaction entre les ions calcium et l'alginate de sodium **[47]**.

La structure chimique de l'alginate affecte sa stabilité, en effet, plus que la teneure en acide guluronique G augmente, en particulier avec un bloc de GG très long, les liaisons cationique devient très favorable et par conséquent la stabilité de gel devient plus élevé.

Le gel d'alginate de calcium est stable dans une large gamme de pH (pH 2-10) et de température (jusqu'à 85 ° C).Cependant, le gel peut être détruit dans un environnement à une forte concentration en sodium, potassium ou magnésium **[48]**.

VI. LA PEROXYDASE :

VI.1. Introduction :

La capacité des peroxydases de traiter les polluants organiques est passée en revue, les méthodes enzymatiques ont généralement les bas besoins en énergie **;** sont facile à contrôler, peuvent fonctionner dans des conditions irrégulières et avoir un minimum impact sur l'environnement.

Les peroxydases ont de larges spécificités de substrat et peuvent catalyser l'oxydation d'une variété de composés organiques. Les résultats prouvent qu'une oxydation enzymatique peut diminuer la toxicité d'un certain hydrocarbure aromatique polycyclique, phénols, pesticides ; les colorants azoïques….etc. **[48]**.

VI.2.Définition :

Les peroxydases (EC.1.11.1.7) sont des enzymes largement distribuées dans la nature, leurs activités ont été identifiées aux plantes, microorganismes, et les animaux ou ils jouent des rôles importants. Les peroxydases sont des hémoprotéines, ils ont un poids moléculaire s'étendue de 30.000 à 150.000 Da. Catalysent la réduction de peroxydes (ROOH) comme accepteur d'électron tels que le peroxyde d'hydrogène et oxydation de variété de composés organiques et minéraux variable d'une classe de peroxydase à une autre**[23]**.

L'hème des peroxydases est constitué par une métalloporphyrine dont l'ion métallique est le fer ferrique (Fe3+) associé à quatre atomes d'azote du noyau tétrapyrrole par quatre liaisons de coordination **[49]**.

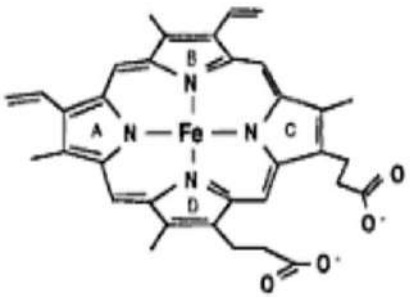


Fig.VI. 1: Structure chimique de l'hème de la peroxydase **[49]**.

L'étude classique du modèle d'une peroxydase du navet permet de découvrir la structure de l'enzyme, Cette structure est à rapprocher de celle des globines étudiées par ailleurs (Fig.VI.2).

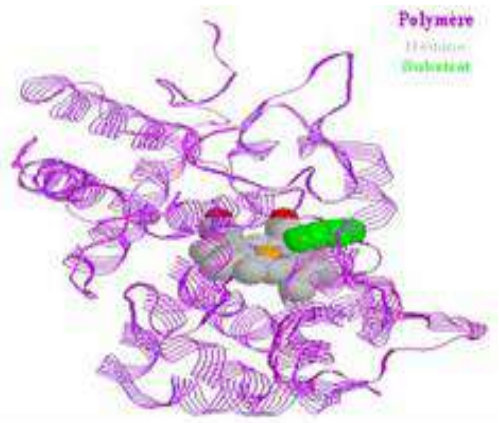


Fig.VI. 2: Structure de la peroxydase de Raifort (navet noir) **[50]**.

La peroxydase tire profit de sa grande surface étant une molécule de grande taille (son poids moléculaire est de 40 000g/mol et sa composition chimique est la suivante: carbone47%, hydrogène 7.35%, azote 13.2%, souffre 0.43%, fer 0.127%) **[51,52]**.

VI.3. Classification :

On distingue deux grandes familles de la peroxydase : les peroxydases animales, principalement détectées chez les animaux, et les peroxydases non animales détectées chez les plantes, les champignons, les bactéries et les protistes **[53, 23]**.

Les peroxydases non animales sont actuellement subdivisées en 3 classes **[53]** :

- **Classe I :** peroxydases intracellulaires ; celles-ci incluent : la peroxydase de cytochrome C de levure (ccp), peroxydase d'ascorbate chloroplaste et de cytosol (APx), et peroxydases bactériennes a gène reproduites **[53,54]**.
- **Classe II :** peroxydases fongiques extracellulaires ; comme : peroxydase de lignine (LiP), et du manganèse (MnP), impliquées dans la dégradation de lignine [**54**,**55**].
- **Classe III :** peroxydases extracellulaires des plantes : tel que la peroxydase classique de raifort (HRP).Navet, courgette,…….etc **[53, 56]**.

VI.4. Cycle catalytique de peroxydase :

Le cycle catalytique de la peroxydase se produit par des réactions en plusieurs étapes, il

Implique :

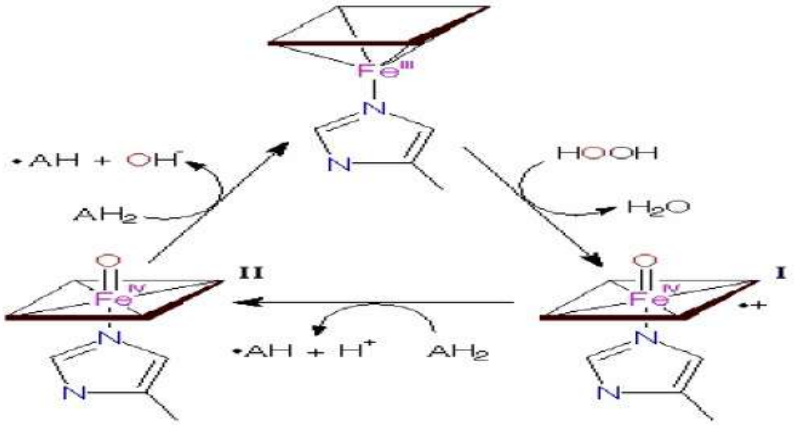


Fig.VI. 3: mécanisme réactionnel de la peroxydase **[52].**

Premièrement, l'enzyme à l'état natif réagit avec un peroxyde d'hydrogène. Cette étape inclue le transfert d'un oxygène de peroxyde vers l'état ferrique d'enzyme pour former un composé intermédiaire instable qui est le composé I (cpd I) avec la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau [**56**].

Dans cette dernière étape, le composé I contient un centre oxyferryl avec un fer sous l'état ferryl (Fe^{IV} = O). Par la suite, le composé I oxyde un substrat (SH) pour donner un radical et le composé II (cpd II) qui à son tour oxyde une seconde molécule de substrat pour donner l'hème native **[56]**.

VI.5.Application industrielles de la peroxydase

Grace à leur diversité, les peroxydases ont été utilisées pour plusieurs applications industrielles, on cite les plus importantes :

- **Dégradation des colorants synthétiques :**

A nous jour, plus de 10000 colorants mis sur le marché international avec une production de 7.10^5tone /an. Ces colorants sont conçus d'une manière qui soit stable et résistantes à la lumière, la température, les détergents et l'attaque microbienne **[48]**.

En effet, plusieurs activités industrielles utilisent ces colorants et en parallèle, environ de 10-15% des colorants synthétiques produits sont déchargés dans les effluents industriels causent des problèmes environnementales grâce à leurs structure moléculaires complexe et résistance à la dégradation biologique **[23]**.

Ces propriétés rendent les méthodes traditionnelles de traitement insuffisantes et inefficaces. Quelques auteurs ont montré que la destruction oxydante des composés colorés est sensiblement stimulée par les enzymes oxydantes, ces colorants contient au moins un groupe aromatique, ce qui leur fait des substances agréables pour des types de

peroxydases ; récemment Bhunia et al(2002), ont montre que la peroxydase de raifort (HRP) soyer efficace en dégradation et précipitation des colorants azoïques importants tel que : bleu de Remazol et rouge de cibarcon **[53]**.

- **Traitement des composés phénoliques** :

Les composés aromatiques, y compris des phénols et des amines aromatiques constituez un des classes principales des polluants. Ils sont trouvés dans les eaux résiduaires d'une grande variété d'industrie tel que : la conversion du charbon, raffinage de pétrole, résines et plastiques, synthèse des colorants….etc.

Les composés les plus aromatiques sont toxiques et doivent être enlevés des eaux résiduaires avant qu'ils soient déchargés dans l'environnement **[53]**.Beaucoup de chercheurs a proposé le traitement enzymatique inclut la polymérisation employer les enzymes redox en présence de H_2O_2suivant la réaction **[23]**:

$$H_2O_2 + 2\,AH_2 \xrightarrow{\text{Peroxydase}} 2H_2O + \text{Polymerized.}$$

- **Synthèse organique et polymère :**

Les radicaux libres produits pour catalyser de peroxydase peuvent participer à différentes réactions post-enzymatiques. La polymérisation oxydante des composés aromatiques négociés par des oxydoréductases a été étudiée pour créer les nouveaux polymères fonctionnels et synthétiser des résines phénoliques sans employer le formaldéhyde toxique qui doit être employé dans la polymérisation chimique **[23]**.

- **Biodétecteurs de peroxydase** :

Un domaine qui offre un grand potentiel pour la peroxydase est son application comme des biocapteurs électrochimiques. Récemment, l'utilisation des électrodes à base de peroxydase est repandue dans les systèmes analytiques. Pour la détermination du peroxyde d'hydrogène et des hydro-peroxydes organiques, la peroxydase est utilisée sous forme immobilisé avec une enzyme produisant peroxyde d'hydrogène **[23]**.

- **Application pour analyse et diagnostique :**

Le lactose contenu en lait et produits laitiers est déterminé par diverses méthodes analytiques pratiques exigeant les personnes qualifiées et instruments sophistiquées : tel que un spectrophotomètre, un biocapteur,….etc **[53]**.

Sharma, Sehgal et Kummer (2002) ont développées une simple et économique technologie de Biostrip pour l'évaluation de lactose et HRP sur un support polymère.

La Biostrip a été plongé en lait ou un produit laitier et un couleur développé a partir d'un chromogène supplémentaire, il a été employé pour estimer le lactose dans la gamme de concentration < 20-100 g/l **[53]**.

VII.GENERALITE SUR LE BIOREACTEUR :

VII.1. Définition :

Les bioréacteurs sont généralement définis comme les dispositifs dans lesquels les processus biologiques ou biochimiques se développent sous un environnement contrôlé (pH, température, pression, apport en nutriments.). Ils sont utilisés de manière classique dans l'industrie agroalimentaire (fermentation et traitement de l'eau) et pharmaceutique (production des protéines) **[57]**.

VII.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 **[58]**. Son dimensionnement et son mode de conduite reposent sur la connaissance des vitesses des réacteurs chimiques et biologiques et de leur couplage avec la vitesse de transfert de substrats lorsque ceux-ci se trouvent dans une autre phase **[59]**.

VII.3. Principaux types de bioréacteurs :

Les bioréactions s'effectuent toujours dans un solvant : l'eau et les concentrations en substrats et produits. Pour obtenir des productions convenables. Il est donc nécessaire de recourir à des volumes réactionnel et temps de séjour importante à des vitesses de réaction sont faibles **[59]**. Selon leurs applications, les réacteurs à enzymes immobilisées fonctionnement soit en discontinu ou en continu :

VII.3.1. Réacteurs discontinus

Dans un réacteur discontinu, les substrats et les biocatalyseurs sont initialement introduits dans le réacteur. On observe donc une diminution avec le temps des concentrations de substrats, les installations fonctionnant en discontinu sont généralement des cuves bien mélangées, avec des concentrations uniformes. Le calcul d'un réacteur discontinu peut consister à évaluer les concentrations de substrats et de produits au bout d'un certain temps de réaction, connaissant la quantité d'enzyme mise en œuvre. Pour ce type d'écoulement, on distingue les réacteurs agitée **[59]**.

VII.3.1.1.Bioréacteur agitée :

Dans les bioprocédés, les réactions sont généralement conduites dans des réacteurs fermés où le catalyseur (sous forme libre ou immobilisée) est mis en contact avec les substrats dans une cuve agitée et éventuellement aérées pouvant fonctionner en discontinu ou en continu pendant un temps donné durant lequel le pH et la température sont contrôlés. La récupération des produits qui suit chaque cycle de biotransformation se fait **[60]**.Les deux types de bioréacteurs sont indiqués dans la figure suivante (Fig.VII .1).

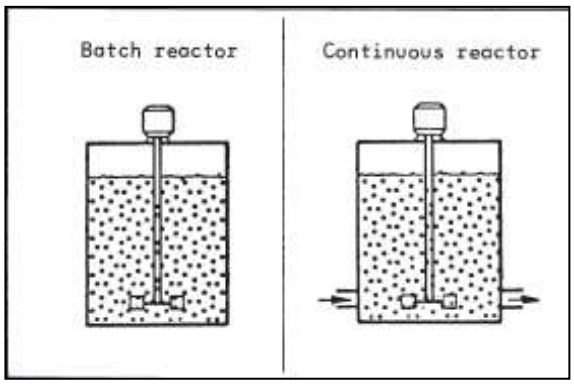


Fig.VII. 1: les deux formes de bioréacteurs agités (fermé et ouvert) avec l'enzyme immobilisée **[61]**.

Malgré sa simplicité, ce type de réacteur comporte plusieurs inconvénients inhérents aux réacteurs fermés tels que la variabilité de la qualité des produits, le cout de main d'oeuvre lie a la fréquence des démarrages et des arrêts, l'utilisation de grands volumes, la perte des enzymes souvent actives en fin de cycle (pour les enzymes solubles) et la nécessite d'une étape supplémentaire de séparation des enzymes du milieu réactionnel**[62]**.

VII.3.2. Réacteurs continus :

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 le débit de soutirage égal au débit d'alimentation.

La performance d'un réacteur continu, exprimé par le degré de conversion du substrat à la sortie du réacteur, en plus la cinétique de la réaction mise en ouvre dépend aussi de l'hydrodynamique de la phase liquide à l'intérieur du réacteur. Il existe, par ailleurs, plusieurs types de réacteurs enzymatiques qui fonctionnent en continu **[59]**.Parmi les différents réacteurs continus on distingue **[59]**:

VII.3.2.1. Bioréacteur à lit :

Les réacteurs à lit sont très populaires pour impliquer de réactions de mise en ouvre des biocatalyseurs particulaires. Dans la plupart des cas ils sont employés pour le traitement continu. Selon la nature des particules constituant le lit et la manière dont le substrat traverse les réacteurs, il existe deux principaux modes de bioréacteurs à lit : bioréacteur à lit fixe ou à lit fluidisé (Fig. VII.2) **[61]**.

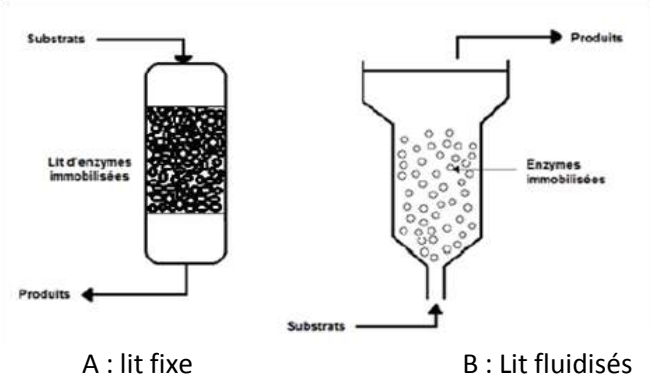


Fig.VII. 2: Construction de quelques types de bioréacteur à lit **[61]**.

- **Bioréacteur à lit fixe :**

Le bioréacteur à lit fixe est actuellement le type de bioréacteur le plus rependu de tous les bioréacteurs pour les biocatalyseurs immobilisée. Il permet l'utilisation des catalyseurs à la densité plus élevée possible **[61]**.La configuration de ce bioréacteur est une colonne remplie d'un garnissage, soit des particules poreuses contenant l'enzyme, soit un support sur lequel peuvent se développer les cellules. L'alimentation peut se faire de bas en haut ou de haut en bas selon le type de construction **[63]**.

Le bioréacteur à lit fixe permet a la fois d'avoir une importante productivité et un produit final exempt d'enzymes étant donné que celles-ci sont confinées dans le bioréacteur, évitant ainsi une étape finale de séparation du biocatalyseur et du produit. L'intérêt d'utiliser cette configuration plutôt que celle du réacteur fermé a été prouvé avec différentes enzymes et dans différentes conditions, ainsi dans la conduite de réactions catalytiques hétérogènes à grande échelle **[64,65]**.Ainsi, Laudani *et al* **[64]** qui a étudie la synthèse de l'oléate d'octyle par la lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) en CO_2supercritique a constaté une amélioration de 10% du rendement de la réaction en passant du réacteur fermé au réacteur à lit fixe. Ce dernier a été également jugé plus pratique notamment pour le contrôle des conditions d'hydratation de l'enzyme.

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 **[62, 65]**.Les bioréacteurs à lit fixe sont couramment utilisés dans les procédés à enzymes immobilisées. Pour le traitement d'eau et d'effluents **[61]**.

- **Bioréacteur à lit fluidisé :**

Contrairement au lit fixe, le réacteur à lit fluidisé est seulement lâchement remplit de particules de biocatalyse. Le substrat entre de au dessous et forcé vers le haut par le lit fluidisée. La condition que la densité des particules est plus grande que de substrat. En outre, la conservation des biocatalyseurs dans le lit, n'est pas trop visqueux, et le débit pas trop haut. Afin de réduire le danger de flushing-out des particules **[61]**. Alors la vitesse d'écoulement est ajustée pour maintenir une fluidisation du garnissage de particules sans les entrainer. La vitesse d'écoulements était supérieure à celle utilisée en lit fixe, la phase liquide est partiellement recyclée de la sortie vers l'entré du réacteur **[59]**.

Le choix entre la couche fixe ou la couche fluidisée dépend du caractère colmatent des solutions à traiter et la taille des particules solides, la fluidisation permet de s'affranchir des risques de colmatage, mais les performances de transfert de matière liquide-solide d'une couche fluidisée sont limitée que celle d'un couche fixe **[63]**.

VII.3.2.2.Réacteur à membrane :

En principe, les réacteurs de membrane sont utilisés pour séparer le grande de petite molécule des substances à l'aide d'une membrane avec les pores extrêmement fins (membrane d'ultrafiltre, microfiltre…..), ce type de réacteur est particulièrement utile pour les

réactions enzymatique puisque la taille des molécules d'enzymes différent souvent considérablement de cela des molécules de produit. D'un côté de la membrane, une légère pression (50000 à 5 millions PA) est appliqué, ceci a comme conséquence le transfert convecteur obligatoire du produit à faible poids moléculaire par les pores de la membrane **[61]**. Plusieurs géométries et configurations de membranes sont utilisées à l'échelle du développement de laboratoire ou de production industrielle **[63]** :

- **Les réacteurs d'ultrafiltration de recyclage** :

Dans cette configuration, des modules d'ultrafiltration sont insérés dans une boucle de recyclage disposée à la sortie du réacteur. Les enzymes sont ainsi continuellement recyclées dans le bioréacteur, avec soutirage en continu d'un perméat ne contenant que les produits de réacteur ; des membranes de géométrie plante ou tubulaire sont utilisées dans des bioréacteurs. Ce type de réacteur est particulièrement adapté aux réactions d'hydrolyse de macromolécules, ou des réactions enzymatiques nécessitant le recyclage de cofacteurs **[63]**.

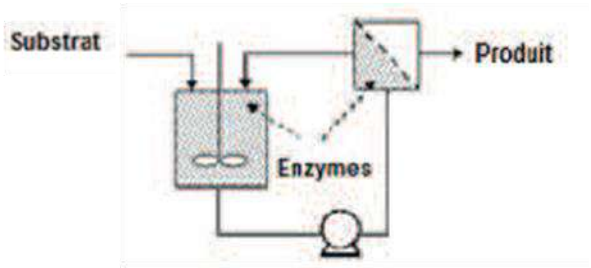


Fig.VII. 3: Réacteur enzymatique continu avec séparation et recyclage des biocatalyseurs par ultrafiltration **[58]**.

- **Les réacteurs à fibres creuses** :

Les ultrafiltres à fibres creuses comportent un nombre très élevé de membranes tubulaires de très faible diamètre interne, la structure de membrane pouvant être symétrique ou asymétriques. Les fibres creuses sont maintenant couramment utilisées pour la dialyse rénale ou pour la concentration de protéines.

Ce type de réacteur peuvent présenter de nombreux avantages, avec des membranes asymétriques, l'immobilisation et la régénération d'enzymes y est aisée. La surface membranaire par unité de volume y est très élevée, d'où des productivités des réacteurs particulièrement fortes **[63]**.

VII.3.2.3.Les réacteurs cellulaires à membranes planes :

Une nouvelle configuration de réacteurs membranaires récemment développée, comprend un compartiment cellulaire, délimité par deux membranes à porosité différente, et pris en sandwich entre un compartiment ou circule le milieu de culture et un autre compartiment dans lequel sont soutirés les produits de la réaction cellulaire. Une membrane de microfiltration, qui retient les cellules mais laisse passer les produits macromoléculaires excrétés par les cellules, sépare les comportements cellules et produits. C'est dans le domaine des productions de protéines par cellules animales **[63]**.

VII.4. Calcul de réacteur à lit fixe :

Dans une première étape, un dimensionnement approché peut être effectué. Une fois la cinétique de l'enzyme est étudiée et connue sous les deux formes libre et immobilisée, le premier appareil à dimensionner est le réacteur, car ses performances ont une incidence sur le reste de l'installation. Donc il est nécessaire de faire un calcul de réacteur à partir de la technique dite "des bilans" (en substrat). Cette modélisation appliquée à l'ensemble du réacteur, se présente sous la forme de l'équation suivante :

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

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.C – D (C+dC) $-v_0\eta$ dV (1-ε)=0

Cette équation devient comme suit

$$D\ dC = -v_o\eta\ (1-\varepsilon)dV \quad \text{.....(5)}$$

Tel que :

C : concentration du substrat en mol/L

D : débit volumique de la solution aqueuse à traiter en L/s

V_0: vitesse de la réaction enzymatique exprimée en mol/ (L.s)

η : facteur d'efficacité du biocatalyseur, $\eta = \frac{V_{immobilisée}}{V_{libre}}$

V: volume du bioréacteur exprimé en L

ε : porosité du garnissage du bioréacteur, pour des particules sphériques **ε=0.4**

L'intégration de l'équation (5) dépend de l'ordre de la réaction enzymatique :

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

$$v_0 = \frac{V_{max}}{K_S}[S]_0 \quad \text{..……..(6).}$$

Le volume du bioréacteur sera déterminé comme suit :

$$V = \frac{K_S D \ln\frac{[S_0]}{[S]}}{V_{max}\eta(1-\varepsilon)} \quad \text{……..(7).}$$

- Si la réaction est Michaelienne ayant la formule suivante :

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]_0}{K_M+[S]_0} \quad \text{……..…..(8).}$$

Le volume du bioréacteur sera déterminé comme suit

$$V = \frac{K_M \ln\frac{[S_0]}{[S]}+[S_0]-[S]}{V_{max}\eta(1-\varepsilon)} D \text{……..(9).}$$

Partie B :

Matériel et méthodes

Introduction :

L'objectif de cette partie expérimentale est l'étude de dégradation d'un colorant azoïque, Le noir ériochrome T (NET), par la peroxydase immobilisée dans un bioréacteur à lit fixe. La peroxydase utilisée est extraite à partir d'une source végétale, le navet blanc, puis purifiée en utilisant un solvant organique, l'acétone.

La stratégie expérimentale de cette étude passe dans un premier temps par la mise en évidence des paramètres cinétiques de dégradation de notre colorant par la peroxydase libre et immobilisée pour passer ensuite au calcul et dimensionnement du bioréacteur à lit fixe.

En deuxième lieu, la suite de l'étude se base sur la variation d'un seul facteur à la fois pour étudier l'effet des facteurs techniques tel que : le débit, la concentration du substrat (colorant) et la stabilité du bioréacteur sur le rendement de décoloration des solutions aqueuses de ce colorant.

VIII. PRODUITS, MATERIELS ET METHODES :

VIII.1. Produits utilisés :

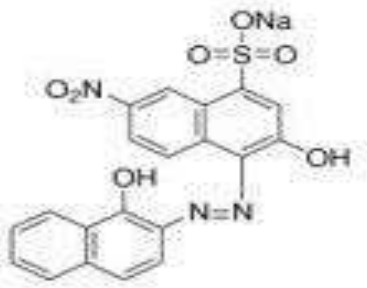
VIII.1.1. Source de l'enzyme "peroxydase" :

La peroxydase est obtenue à partir d'une source végétale : le navet blanc local "***Brassica Rapa***", très disponible dans le marché algérien. Il présente le meilleur rapport entre la facilité de préparation, de conservation et la variété des applications**.**

VIII.1.2. Substrats de la peroxydase :

- **Colorant** : Le colorant commercial azoïque qui a été utilisée au cours de cette étude est le "Noir ériochrome T" : aussi appelé selon colour index C.I.14645. C'est un colorant organique du type direct monoazoïque. L'ensemble des propriétés physico-chimiques de ce colorant sont récapitulées dans le tableau suivant (Tableau. VII.1) :

Tableau. VIII. 1 : Caractérisation physicochimique de noir ériochrome T.

Propriétés	**Noir ériochrome T (NET)**
Aspect	Solide noir
Solubilité	80 g/L dans l'eau à 20°C
Formule Brute	$C_{20}H_{12}N_3NaO_7S$
Formule Développée	
Masse molaire	M=461.38 g/mole

- **Peroxyde d'hydrogène** : H_2O_2(30%), M = 34.01 g/L.
- **Phénol :** C_6H_6O, M = 94.111 g/mole.

Substrats pour test d'activité enzymatique : peroxyde d'hydrogène et phénol sont utilisés dans le test d'activité enzymatique de la peroxydase pour évaluer sa concentration en UI/mL mais il est indispensable d'ajouter un autre produit utilisé comme un chromogène appelé : le **4-amino-antipyrine**$C_{11}H_{13}N_3O$**,** M= 203.25 g/mole.

VIII.1.3. Solvant de purification : Acétone, C_3H_6O (85%), M= 58.078 g/mole, d = 0.819.

VIII.1.4.Produits utilisés dans le dosage des protéines :

- **Protéine standard :** solution d'albumine bovine SAB.
- **Réactif de Bradford ;** composé par :
    - Bleu de Comassie G250.
    - Acide ortho phosphorique H_3PO_4 (85%), M = 97.995 g/mole, d = 1.70.
    - Ethanol C_2H_6O (95%), M= 46.068 g/mole, d = 0.81.

VIII.1.5. Produits utilisés dans l'immobilisation :

- **Support d'immobilisation :** Alginate de sodium, $(C_6H_7NaO_6)_n$, M=198.105 g/mole.
- **Agent de gélification :** Chlorure de calcium **(**$CaCl_2$), M= 110.984 g/mole.

VIII.1.6. Solutions tampons :

- Solution tampon pH 2.0 : préparé par KCl à 0.01M et ajusté par HCl 0.2M.
- Solution tampon pH 6.0 : préparé par KH_2PO_4 0.01M et ajusté par NaOH 0.2M.

VIII.2.Matériel utilisé :

VIII.2.1. Equipements :

- Spectrophotomètre UV –Vis (PERKIN-ELMER 550 A).
- Centrifugeuse.
- pH-mètre.
- Mixeur.
- Agitateur.
- Balance.
- Chronomètre.
- Micromètre.

VIII.2.2. Verrerie :

- Tubes à essai.
- Fioles jaugées (10, 20, 50, 100, 250,1000 mL).
- Pipettes (1, 5,10 mL).
- Erlenmeyers.

- Eprouvettes (50 mL).
- Cristallisoir.
- Béchers.
- Burette (100 mL)

VIII.2.3.Dispositif expérimentaux : Deux montages expérimentaux, ayant des formes géométriques différentes, ont été utilisés à différentes étapes de réalisation de notre étude:

- **Dispositif de purification par l'acétone** : Ce montage comprend une burette de 100mL contient de l'acétone, en dessous de laquelle se trouve un erlenmeyer contenant l'extrait brut du navet à purifier placé dans un cristallisoir contenant des glaces. Pour une meilleure homogénéisation de mélange l'ensemble est mis sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique**.**



Fig. VIII. 1: Dispositif de purification de la peroxydase par l'acétone.

- **Dispositif de bioréacteur à lit fixe** : le bioréacteur approprié pour notre étude est le bioréacteur à lit fixe qui est une colonne ayant des dimensions (hauteur et diamètre) bien déterminées selon des études faites sur la décoloration du NET par la peroxydase sous forme libre et immobilisée. La colonne contient l'enzyme peroxydase immobilisée par inclusion dans les billes d'alginate de calcium alimenté par une solution en utilisant une pompe immergée dans un réservoir contenant le mélange réactionnel. Au dessous de la colonne se trouve des tubes pour récupérer la solution après traitement.

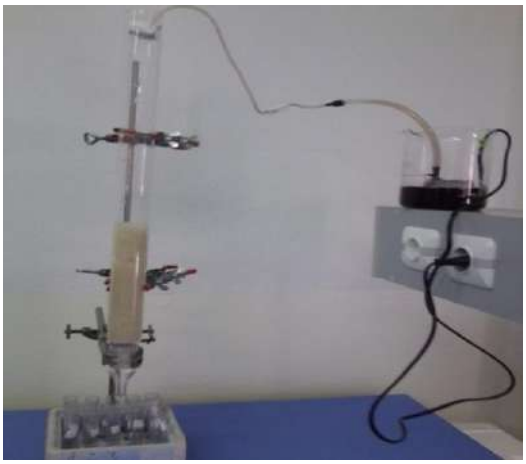


Fig. VIII. 2: Dispositif d'un bioréacteur à lit fixe.

VIII.3. Méthodes expérimentales :

VIII.3.1. Extraction de la peroxydase :

La peroxydase est une enzyme largement disponible dans la nature. Elle peut se trouver dans les plantes, les microorganismes, et les animaux. Pour notre étude, on s'intéresse à la peroxydase des plantes, particulièrement à la peroxydase extraire de navet, riche en peroxydase **(voir annexe A.1),** avec une structure stable et facile à analyser.

L'extraction de peroxydase à partir de navet a été réalisée selon le protocole suivant **[66]** :

100g de navet épluchée et coupée en morceau a été homogénéisé avec 200 mL d'eau distillé dans un mixeur pendent 5 minutes, le mélange est ensuite filtré sur quatre couches d'une gaze propre (Fig.VIII.3). L'extrait obtenu est considéré comme source de la peroxydase brute. Il est conservé immédiatement sous 4°C pour des utilisations ultérieures

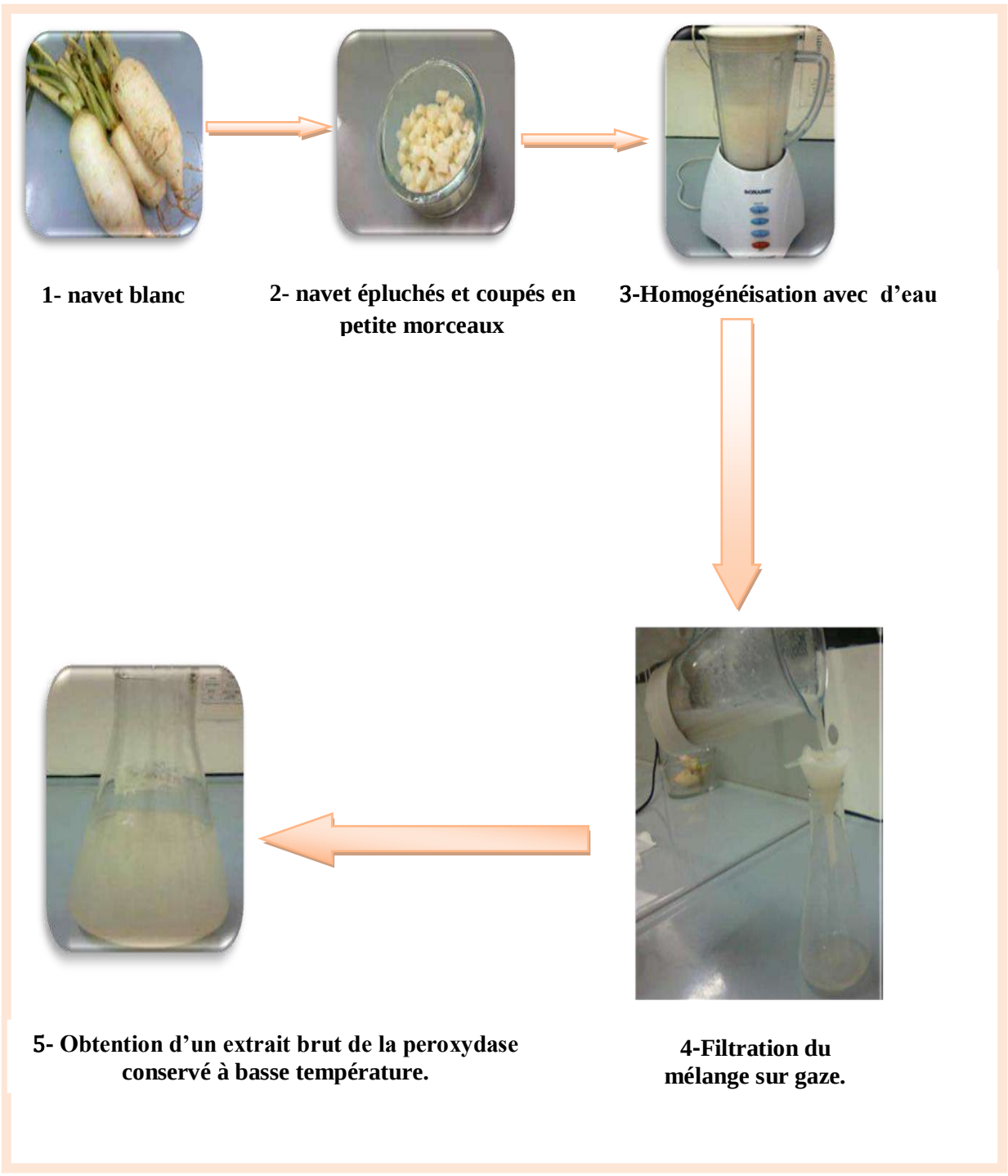


Fig. VIII. 3: Protocole d'extraction de la peroxydase à partir du navet.

VIII.3.2.Purification de la peroxydase par l'acétone:

La purification par l'acétone a été réalisée en utilisant le dispositif 1 ; 200mL de l'acétone (85%) prés-refroidi est ajouté et versé goutte à goutte dans 200 mL de solution de peroxydase brute **[66]**. Les étapes de la purification sont illustrées dans la figure ci-dessous (Fig.VIII.4).



1-Addition de l'acétone à l'extrait brute.

2- Conservation du mélange dans le réfrigérateur à 4° C.





3-Centrifugation du mélange.



4-Formation du culot.

5-Dissolution de la masse récupérée dans un volume de 25 ml d'une solution tampon pH 6.



Fig. VIII. 4: Protocole de purification de la peroxydase par précipitation à l'acétone.

VIII.3.3. Mesure de l'activité enzymatique des extraits avant et après la purification:

La réaction utilisée pour mesurer l'activité enzymatique dans notre étude inclue le peroxyde d'hydrogène qui réagit rapidement avec le phénol et le 4-amino antipyrine en présence de peroxydase du navet selon la réaction suivante [66] :

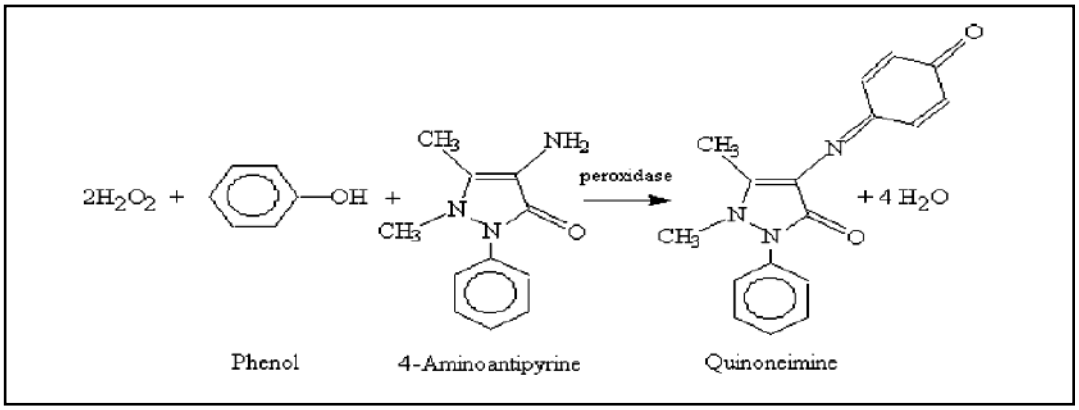


Fig. VIII. 5: Réaction entre le phénol et la peroxydase de d'hydrogène en présence de 4- amino-antipyrine et la peroxydase **[66]**.

La peroxydase consomme deux molécules de peroxyde d'hydrogène pour oxyder une molécule de phénol en présence de 4-amino-antipyrine qui joue le rôle d'une substance donneur d'hydrogène. Le produit obtenu est un chromogène de Quinoneimine qui possède une couleur rose absorbe la lumière visible à une longueur d'onde maximale de 517 nm.).
Le mélange réactionnel utilisé pour doser cette activité est préparé dans une fiole de 50 mL, contient les produits suivants :

- 1 mL de H_2O_2 à 0.1M.
- 1 mL de phénol à 0.1M.
- 1 mL de 4-amino-antipyrine à 0.01M.
- Compléter par la solution tampon pH 6 jusqu'à 50 mL.

La réaction est déclenchée en ajoutant 0.2 ml d'extrait enzymatique à 4 ml de mélange préparé précédemment, et on suit rapidement le développement du couleur sous une langueur d'onde de 517 nm. **[66].**L'intensité de la couleur est convertie en concentration en utilisant un coefficient d'extinction de 6.572 mL.cm/µmol **(voir annexe II).**

➢ **Dosage de la quantité des protéines des extraits avant et après la purification:**

Le dosage de la quantité de protéines de chaque extrait (brut, partiellement purifié) est réalisé par la méthode de Bradford **[67]**, la procédure de cette méthode avec le graphe sont commentés dans l'annexe III **(Voir annexe III)**.

VIII.3.4. Cinétique et effet de la concentration du NET sur la biodégradation du colorant avec la peroxydase libre :

Toutes les expériences réalisées au cours de cette partie ont été effectuée, en appliquant le même protocole. Le mélanges réactionnel doit contenir : le colorant (NET) et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2comme des substrats, une solution tampon de pH_{opt} =2 pour assurer un milieu acide ou la peroxydase donne son point d'activité maximale de dégradation du colorant NET [66]. La démarche de l'expérience consiste à étudier la dégradation du colorant (NET) à différentes concentrations allant de 10–80 mg/L, en fonction du temps sur un intervalle allant de 10min à 40min avec un pas de 10 min. Tout d'abord on prépare une solution du colorant de concentration de 1 g/L, et une solution d'hydroxyde d'oxygène de concentration de 1M. La cinétique de dégradation du NET par la peroxydase est étudiée selon la procédure suivante :

- Pour chaque concentration, le milieu réactionnel est préparé dans une fiole de 50 mL, dans laquelle on introduit :
  - 2.5 mL de H_2O_2 à concentration de 1M.
  - Un volume de colorant variable de 0.5mL jusqu'à 4mL pour atteindre les concentrations appropriés dans le milieu réactionnel.
  - Compléter le volume jusqu'à 50 mL par une solution tampon pH 2.
  - Mesurer la densité optique initiale à λ_{max}= 513 nm.
- Prendre 4 tubes à essai, dans chacun introduire 5 ml de mélange réactionnel préparé.
- Régler le chronomètre a 40 min, et chaque 10 min injecté 0.2 mL de l'EEPP.
- Centrifuger les contenus des tubes pendent 5 min à 4000 tr/min et mesurer la DO de chaque solution.

Cette expérience nous permet non seulement d'étudier la cinétique de dégradation du colorant NET mais de déterminer l'influence de la concentration initiale du colorant sur la vitesse initiale **[66].**

VIII.3.5. Etude de dégradation de colorant avec le paroxydase immobilisée :

VIII.3.5.1. Préparation des billes de la peroxydase immobilisée :

L'exploitation de la technique d'immobilisation des enzymes offre de nombreux avantages. Elle permet d'améliorer la stabilité des enzymes et d'augmenter leurs activités catalytiques, d'où sa réutilisation à nouveau.

A prendre en considération le choix de support, l'alginate est l'un des biopolymères le plus fréquemment utilisé pour l'immobilisation par inclusion, non seulement grâce à ses propriétés de gélification, mais aussi grâce à sa non toxicité.

L'immobilisation à été réalisée selon le protocole suivant **[66]**:

- Dans un bécher, dissoudre 0.15 g d'alginate de sodium dans 10 mL de la peroxydase sous forme libre.
- Laisser le mélange peroxydase /alginate de sodium sous agitation jusqu'à l'obtention d'un mélange visqueux homogène.
- Laisser le mélange au repos pendant 20 min pour éviter la formation de bulles d'air qui peuvent causer la flottation des billes à la surface de la solution de $CaCl_2$.
- Préparer les billes de la peroxydase immobilisée, en faisant verser le mélange obtenu goutte à goutte à l'aide d'une seringue, dans 50 mL de solution $CaCl_2$ (0.05 M.)
- Laisser les billes sous agitation dans la solution de $CaCl_2$ pendant 1 heure.
- Rincer les billes avec l'eau distillée et les conserver dans une solution tampon de pH6 dans un réfrigérateur sous une température de 4°C.

Le protocole de l'immobilisation de la peroxydase par l'alginate de sodium est détaillé dans le schéma suivant (Fig.VIII.6) :

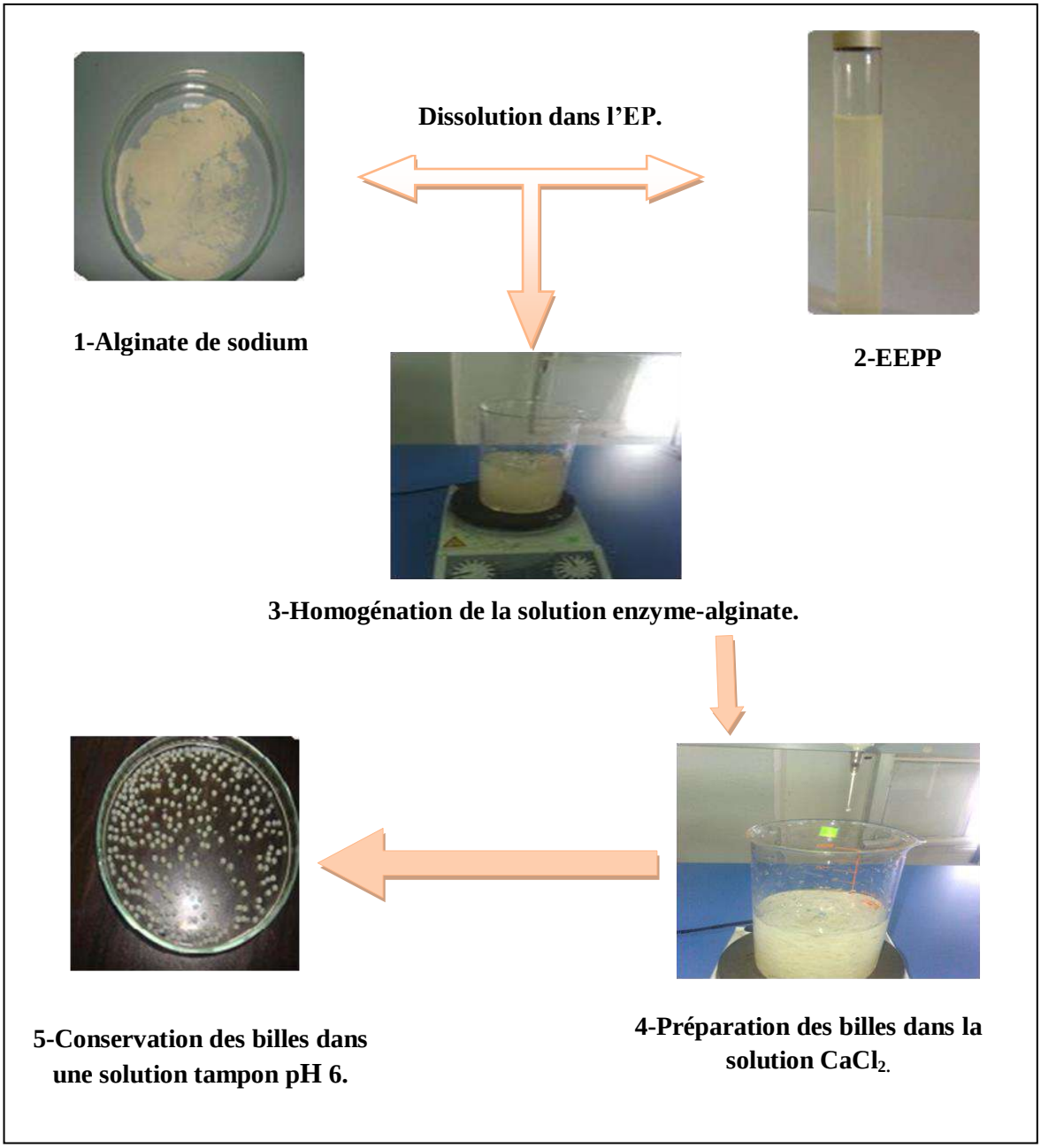


Fig. VIII. 6: Protocole d'immobilisation de peroxydase dans l'alginate de sodium.

VIII.3.5.2.Caractérisation physico-chimique des billes :

Après immobilisation, on procède à la caractérisation des billes d'alginate par la détermination de la masse et du diamètre moyen de chaque particule. (Utilisent un micromètre.), et la concentration d'enzyme par bille. Ceci permettra de valoriser l'effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique de l'enzyme libre partiellement purifié et calculer le nombre des billes équivalent pour atteindre la même activité enzymatique avec l'enzyme libre.

VIII.3.5.3. Cinétique en batch de la dégradation du NET par la peroxydase immobilisée :

La procédure est identique à celle conduite avec l'enzyme libre, l'expérience est maintenue sous les conditions de pH 2.0, à température ambiante, 25 billes d'alginate, $[H_2O_2]_0$=0.05 M en faisant varier la concentration du colorant NET de 20-200 mg/L sur un intervalle du temps allant de 10min à 70 min avec un pas de 10 min.

VIII.3.6. Etude de dégradation de colorant NET avec la peroxydase immobilisée dans deux bioréacteurs à lit fixe :

Le bioréacteur à lit fixe est une colonne de diamètre et de hauteur bien défini (Fig.VIII.2), rempli d'un garnissage de particules poreuses contenant l'enzyme. Le choix du design et la configuration du bioréacteur est basé sur plusieurs paramètres physiques, chimiques et environnementaux .Le dimensionnement du bioréacteur à lit fixe se base sur les paramètres cinétiques étudiés précédemment qui caractérisent le type de réaction mise en œuvre, le coût de réalisation, et la quantité à produire ou à dégrader **(voir la partie A synthèse bibliographique).**

Après cette étape, on va évaluer les paramètres techniques qui influencent directement le rendement de décoloration du NET dans le bioréacteur à lit fixe: le débit d'alimentation, la concentration du colorant et la continuité du procédé.

VIII.3.6.1. Etude l'effet de débit d'alimentation sur le rendement de décoloration :

Le contrôle de la quantité du substrat injecté dans un bioréacteur constitue une étape critique dans l'étude d'un tel paramètre. Elle peut causer des limitations diffusionnelles au cours du traitement. Pour éviter ce problème, il faut standardiser le débit d'alimentation du substrat entrant dans le bioréacteur

L'expérience se déroule en utilisant deux bioréacteurs à lit fixe ayant différentes dimensions. L'influence du débit d'alimentation sur le rendement de décoloration de NET dans les deux bioréacteurs est étudié en préparant le mélange réactionnel suivant : [NET]=50mg/L, $[H_2O_2]$= 0.05M, pH_{opt}= 2. Ce mélange sera injecté à l'aide d'une pompe pour garder le débit constant dans le bioréacteur de 100 mL/h jusqu'à 700 mL/h avec un pas de 100 mL/h. Les solutions obtenues après un écoulement du mélange réactionnel sont récupérées à la sortie du bioréacteur par fraction de 10 mL. Pour chaque débit les cinq premières fractions sont récupérées, centrifugées et analysées à l'aide d'un spectrophotomètre à 513 nm.

VIII.3.6.2. Etude de l'effet de concentration d'un seul substrat (colorant) sur le rendement de décoloration :

On procède ensuite à étudier l'influence de la variation de la concentration du colorant sur le rendement de dégradation, en appliquant le protocole suivant :

On prépare une série de solutions de NET à différentes concentrations de 50 mg/L jusqu'à 250 mg/L avec un pas de 50 mg/L. Ces solutions sont pompées séparément dans les deux réacteurs avec un débit constant égal à 400 mL/h. Les fractions traitées sont récupérées et analysées à l'aide d'un spectrophotomètre à 513 nm.

VIII.3.6.3. Stabilité du bioréacteur :

La durabilité des procédés est parmi les objectifs majeurs dans le développement industriel. Le fonctionnement stable et répété pendant une longue duré permet de rentabiliser le procédé. Pour notre cas on soumet les deux bioréacteurs à un essai de continuité de dégradation de colorant azoïque, sous les mêmes conditions afin de tester leur stabilité. Le protocole suivant est réalisé :

On prépare une solution du colorant de concentration de 100 mg/L. Cette solution est pompée séparément dans les deux réacteurs avec un débit constant égal à 400 mL/h. Les fractions récupérées sont analysées à l'aide d'un spectrophotomètre à 513 nm. L'essai est répété chaque jour de façon continue pendant 10 jours.

Partie C :

Résultats et discussion

IX. Résultats et discussion:

IX.1. Extraction et purification de la peroxydase :

Pour comparer les deux extraits enzymatiques obtenus avant et après la purification, il est nécessaire de déterminer la quantité de protéines et doser l'activité enzymatique de la peroxydase présente dans l'extrait du navet brut et semi purifié.

IX.1.1.Calcul de l'activité enzymatique pour les deux extraits :

L'avancement de la réaction est déterminé par la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 517 nm, qui indique l'évolution d'une couleur rose résultant de la décomposition du H_2O_2 et le phénol pour former le Quinoneimine.

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 A.2).** Le tracé de l'évolution de concentration de chromogène Quinoneimine produit au cours du dosage de l'activité des deux extraits (EEB, EEPP) en fonction du temps donne les allures représentées sur la figure suivante (Fig.IX.1) :

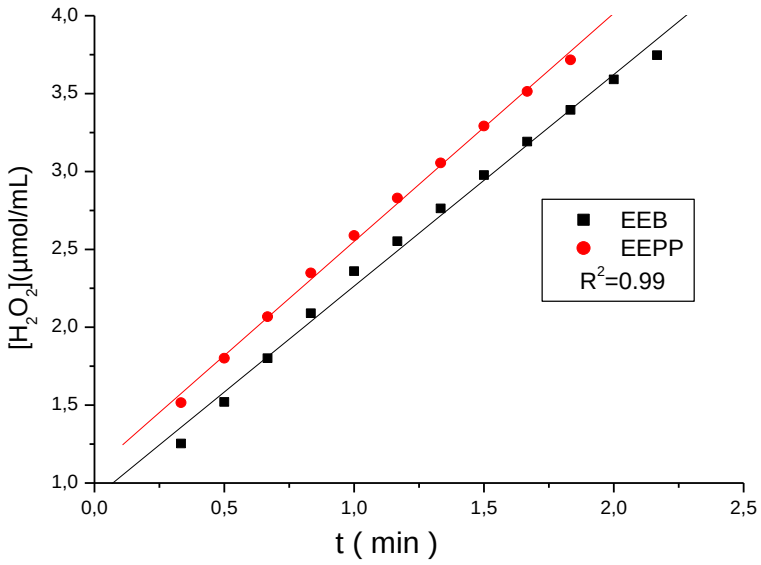


Fig. IX. 1: Activité enzymatique pour les deux extraits: EBB, EEPP.

IX.1.2.Dosage de la quantité de protéines :

Le dosage de la quantité de protéine est nécessaire, il nous permet de calculer l'activité spécifique et par conséquent, de déterminer le facteur de purification de l'enzyme peroxydase. La méthode utilisée dans notre cas est la méthode de Bradford **(voir annexe A.3)**. Tout

d'abord, on trace la courbe d'étalonnage, qui représente la densité optique (ou absorbance) relative au maximum d'absorption, en fonction de la concentration C de la protéine standard (SAB), obéissant à la loi de Beer-Lambert qui s'écrit comme en suite :

DO=0.00223 [SAB].

La quantité de protéines des deux extraits enzymatiques bruts et semi purifié est déterminée en utilisant cette équation. Les valeurs obtenues sont présentés dans le tableau (Tableau. XI.1) :

✓ **Comparaison entre les deux extraits EEB, EEPP :**

Les résultats de l'activité enzymatique et la quantité des protéines totale contenant dans les extraits ne sont pas suffisantes. On fait appel, alors à des notions et à des termes précis : l'activité spécifique, le facteur et le rendement de la purification.

- **Activité spécifique** : est l'activité par rapport à la quantité totale de l'ensemble des protéines dans la préparation. Elle est généralement exprimée en unités internationale (UI) par poids de protéines totales.
- **Rendement de purification** : est la proportion en % de la quantité de la protéine purifié qui reste par rapport à quantité initiale.
- **Le degré de la purification** : est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique par rapport à la première étape.

On résume les résultats obtenus dans le tableau suivant :

Tableau. IX. 1: Caractérisation des deux extraits avant et après purification.

extrait	Protéine totale (mg)	Activité totale(UI)	Activité spécifique (UI/mg protéine)	Facteur de purification	Rendement de purification(%)
EEB	1108.57	7707.57	6.95	1	100
EEPP	212.32	2606.75	10.07	1.45	33.82

Les résultats montrent que l'extrait enzymatique brut, obtenu à partir du navet est caractérisé par une activité catalytique totale brute de 7707.57 UI. Mais au cours de l'étape de purification par l'acétone, on remarque que cette activité chute à une valeur de 2606.75 UI; alors que l'activité spécifique et le facteur de purification augmentent. La purification par

précipitation à l'acétone permet donc l'obtention donc d'une protéine active plus pure. En effet, chaque étape supplémentaire qui permet d'augmenter la pureté et la stabilité de l'enzyme avec le temps, cause une perte de l'activité totale de la peroxydase par dénaturation ou lors de la séparation.



(B) (A)

Fig. IX. 2: Aspect des deux extraits : A) Extrait brut, B) Extrait enzymatique partiellement purifié par précipitation à l'acétone.

IX.2. Cinétique et effet de la concentration du NET sur la biodégradation du colorant par la peroxydase libre et immobilisée :

L'objectif est de déterminer les constantes cinétiques de la dégradation de notre colorant par la peroxydase libre et immobilisée sous les conditions physico-chimiques optimales. Cette étude comprend : la cinétique de la décoloration, l'effet de la concentration du substrat colorant sur le rendement de décoloration et sur la vitesse initiale de l'enzyme peroxydase.

IX.2.1.Cinétique de dégradation du colorant (NET) par la peroxydase libre :

L'étude de la cinétique de décoloration du NET par la peroxydase libre permet de calculer les vitesses initiales et les rendements de biodégradation de notre colorant à différentes concentrations. Cette étude permet aussi de déterminer le temps nécessaire pour le déroulement de la réaction. Les résultats de cette expérience sont illustrés sur la figure (Fig.IX.3):

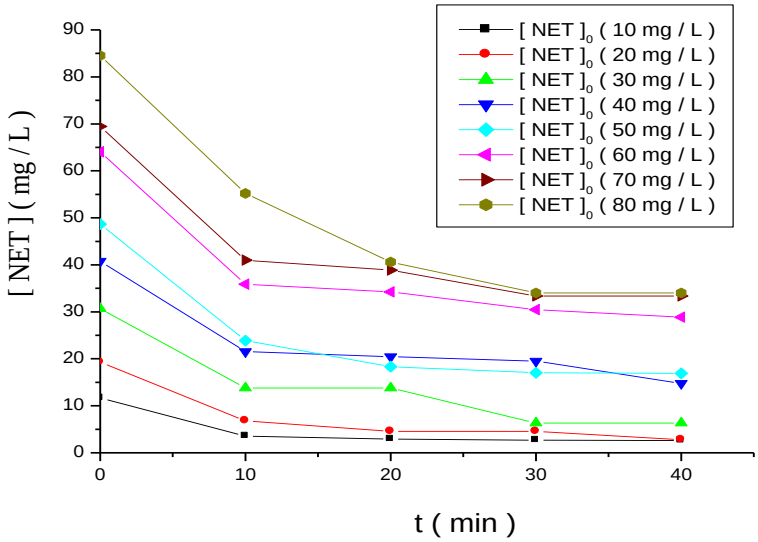


Fig. IX. 3: Cinétique de décoloration de (NET) par peroxydase libre à différentes concentrations (pH=2, T=25°C, $[H_2O_2]_0$ = 0.05M, AE= 0.217 UI/mL).

A partir de cette courbe, nous pouvons constater que la dégradation du colorant azoïque NET par EEPP est rapide telle que au bout de 10min plus de 50% du NET est disparu pour toutes les concentrations initiales. Donc, la détermination de la vitesse initiale de la réaction se fait dans l'intervalle de temps entre 0 et 10 minutes.

IX.2.2. Effet de la concentration initiale du colorant sur le rendement et sur la vitesse de décoloration :

La majorité des réactions enzymatiques impliquent plusieurs substrats et libèrent plusieurs produits. Pour réduire la complexité d'étude, le développement de la cinétique enzymatique de ces systèmes consiste à traiter les enzymes comme des enzymes à un seul substrat. L'objectif principal de ce test est de déterminer la concentration optimale de colorant donnant la vitesse et le rendement optimaux.

Pour étudier l'effet de ce paramètre, on se base sur le calcul de deux grandeurs intrinsèques : le rendement et la vitesse initiale.

- Le rendement est déterminé par la relation suivante :
  - $R\,(\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} * 100$..... (10).

La vitesse de décoloration est déterminée à partir de la pente de la partie linéaire de la courbe qui représente la disparition du substrat colorant au cours du temps. Comme dans notre cas et pour toutes les concentrations, la disparition se fait dans les premières dix minutes, la vitesse

sera donc déterminée avec la méthode cinétique et plus particulièrement entre les deux points de temps 0 et 10min selon l'équation suivante :

- $v_0 = \frac{C_{t=10} - C_{t=0}}{t}$ ..... (11).

L'expérience précédente permis de calculer la vitesse initiale (la partie linéaire de la courbe de la cinétique de dégradation de NET à différentes concentrations (Fig.IX.3). De même pour le rendement de décoloration pour chacune des concentrations [10-80 mg/L]. La variation de la vitesse initiale et le rendement de décoloration en fonction de la concentration initiale du colorant est représentée dans la figure (Fig.IX.4).

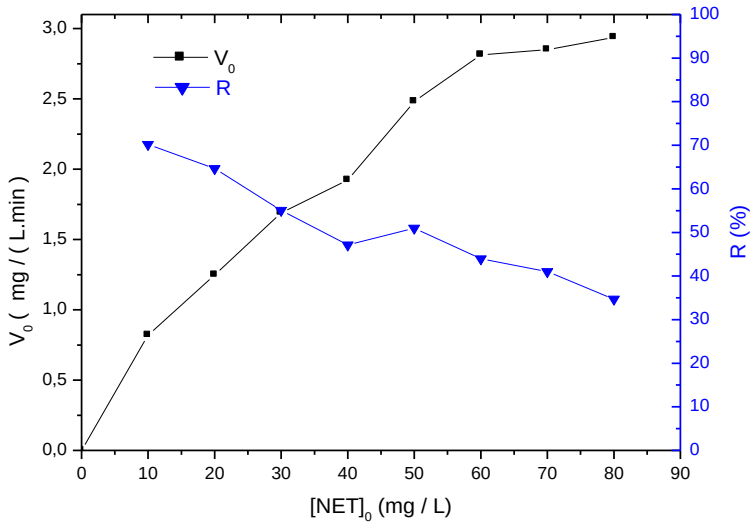


Fig. IX. 4: Effet de la concentration du NET sur le rendement et sur la vitesse de décoloration (pH=2, T=25°C, $[H_2O_2]$ =0.05M, [E]= 0.217 UI/mL, t=10min).

La fiqure (Fig.IX.4) montre que :

- La courbe du rendement et la vitesse s'évaluent dans des sens opposés. Le rendement de décoloration est maximal pour les faibles valeurs de concentration du NET.
- Par ailleurs, la vitesse mesurée augmente en fonction de la concentration du NET. L'allure du graphe qui représente cette variation est une hyperbole ; Cette évolution suit le modèle de Michaelis-Menten.
- Quand la concentration de NET est inférieure à 50 mg/L, la vitesse est proportionnelle à la concentration du substrat. Dans ce cas, la réaction est du premier ordre. Au-delà de 50 mg/L jusqu'à 60 mg/L, la cinétique est d'ordre mixte par rapport au substrat. A partir de 60 mg/L, la vitesse de réaction est indépendante de la concentration du substrat et tend

vers une valeur constante (V_{max}). la vitesse est d'ordre zéro ($V_o = K_2 [E]_T$). Cela traduit par un phénomène de saturation [31].

- L'intersection des courbes de rendement avec celle de la vitesse définie la concentration optimale de NET qu'est égale à 30 mg/L pour laquelle on a un rendement de 55.08%.

IX.2.3. Détermination des constantes cinétiques de la peroxydase libre :

La vitesse maximale V_{max} et la constante michaelienne K_M représentent les caractéristiques de la peroxydase de navet sous les conditions expérimentales étudiées. Pour calculer les valeurs exactes de ces paramètres cinétiques on procède à la linéarisation de Lineweaver-Burk. Le tracé de $1/V_0$ en fonction de $1/ [NET]_0$ donne la courbe suivante (Fig. IX.5):

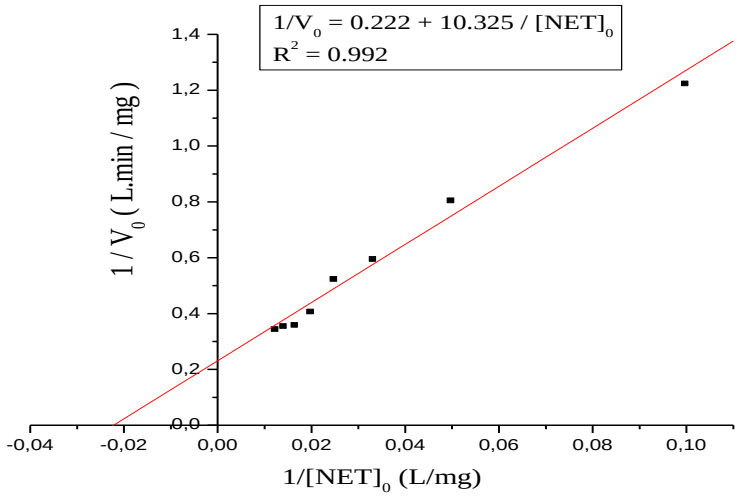


Fig. IX. 5: Linéarisation de Lineweaver-Burk dans le cas de la peroxydase libre.

De cette équation on peut tirer les paramètres cinétiques :

$$\frac{1}{V_{max}} = 0.222 \quad \Longrightarrow \quad V_{max} = 4.504 \text{ mg/L.min.}$$

$$\frac{K_M}{V_{max}} = 10.325 \quad \Longrightarrow \quad K_M = 46.50 \text{ mg/L.}$$

La vitesse initiale est donc liée à concentration du NET.

$$V_0 = \frac{4.504 * [NET]}{46.50 + [NET]} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (12).$$

IX.3.Cinétique et effet de la concentration du NET sur la biodégradation du colorant avec la peroxydase immobilisée :

IX.3.1. Caractérisation physico-chimique des billes d'alginate de la peroxydase :

La méthode d'immobilisation de notre extrait enzymatique partiellement purifié sous les conditions expérimentales déjà mentionnées, conduit à l'obtention de billes homogènes, suffisamment rigides caractérisées par :

- Une masse de 7.15mg/bille.
- Un diamètre de 2.206 mm/bille.
- Un volume moyen de 5.62 mm^3/bille.
- Une masse volumique d'une bille est 1.274 g/cm^3.
- Une activité catalytique de 0.028UI/bille.

Le réseau tridimensionnel d'alginate de calcium assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en empêchant la fuite de ce dernier à travers les pores de la matrice. Pour s'assurer de ça, la solution tampon dans laquelle les billes sont conservées après l'immobilisation a subi un test d'activité enzymatique et aucune activité n'a été détectée.

IX.3.2. Cinétique de dégradation du NET par la peroxydase immobilisée:

L'étude de l'influence du temps de contact est un pré-requis nécessaire. Le tracé de l'évolution de la concentration résiduelle de NET en fonction du temps, au cours de sa décoloration par la peroxydase donne l'allure montrée sur la figure suivante (Fig. IX.6).

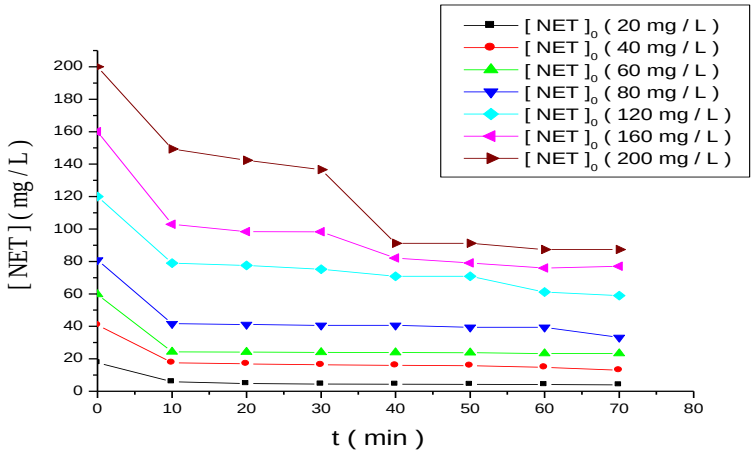


Fig. IX. 6: Evaluation de la concentration de NET par peroxydase immobilisée en fonction du temps (pH=2, T=25°C, $[H_2O_2]$=0.05M, [E]=0.028 UI/ bille).

La figure (Fig. IX.6) montre :

- La mise en contact des billes de la peroxydase avec le colorant résultent une décoloration, A mesure que le temps s'écoule, la quantité de NET dégradé augmente.
- L'immobilisation d'enzyme influence sur la vitesse de dégradation on constate qu'elle est inférieur par rapport à celle obtenue avec l'enzyme libre. Cela est justifié par les phénomènes de diffusion qui affectent la cinétique intrinsèque de l'enzyme [66].
- Une autre raison d'abaissement de la vitesse peut être assimilée au grand poids moléculaire de la molécule de NET (M= 461.38 g/mole) qui lors de sa diffusion, elle entre en interactions stériques avec la matrice.
- les vitesses initiales de chaque concentration sont définies dans les dix premières minutes.

A partir de ce résultat, la mesure de la vitesse initiale de la réaction pour la suite de l'étude sera effectuée dans les premières 10 minutes.

IX.3.3.Effet de la concentration initiale du NET sur la vitesse initiale :

Pour bien maitriser l'effet de l'immobilisation de la peroxydase sur le processus de décoloration, on examine l'effet de la concentration initiale de notre colorant (NET) sur la vitesse initiale et le rendement de décoloration. Les résultats sont traduits dans la courbe suivante (Fig. IX.7):

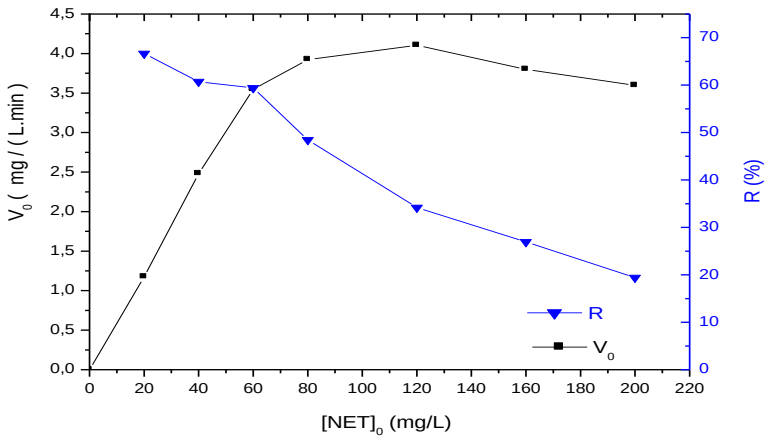


Fig. IX. 7: Effet de la concentration initiale sur le rendement de décoloration du NET avec la peroxydase immobilisée (pH=2, T=25°C, $[H_2O_2]$=0.05M, t=10 min).

Les courbes obtenues (Fig. IX.7) reflètent plusieurs points :

- Le rendement de décoloration diminue pour les fortes concentrations en NET.
- La concentration optimale de colorant obtenue par l'intersection des deux courbes est 60 mg/L. Cette valeur démontre l'hypothèse que l'enzyme immobilisée se trouve protégée contre les concentrations inhibitrices de son substrat [31].
- La courbe de vitesse correspondante à une hyperbole. Elle varie également selon le modèle de Michaelis-Menten. Elle présente deux points intéressants pour l'étude comparative avec l'enzyme libre : La V_{max} et la K_M.
- L'intersection des courbes de rendement avec celle de la vitesse définie la concentration optimale de [NET] qu'est égale à 60 mg/L pour laquelle on un rendement de 59.42%.

IX.3.4. Détermination des constantes cinétiques apparentes de la peroxydase immobilisée :

Afin de déterminer Les constantes cinétiques, on procède toujours avec la linéarisation de Lineweaver-Burk on prend l'inverse de l'équation de Michaelis-Menten (Fig. IX.8).

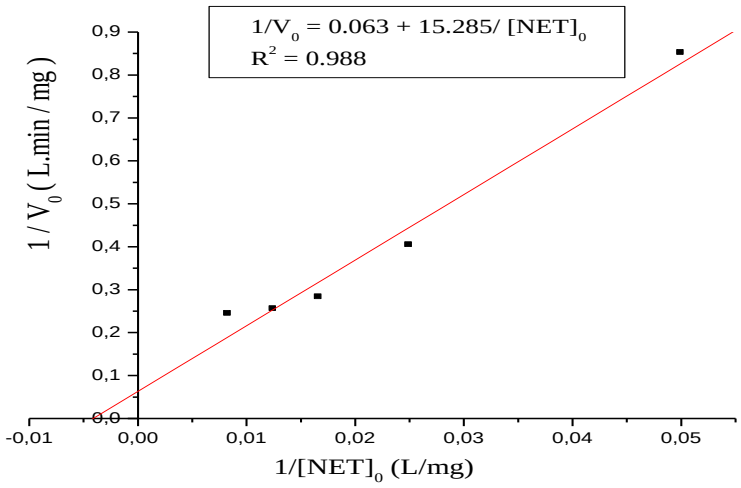


Fig. IX. 8: Linéarisation de Lineweaver- Burk dans le cas de la peroxydase immobilisée.

- La linéarité du tracé de $1/V_0$ en fonction de $1/ [NET]_0$ (Fig. IX.8), pour tous les concentrations initiales, permet de vérifier le modèle cinétique de Michaelis-Menten. La pente de la droite obtenue, est équivalente à (K_M/V_{max}) et son ordonnée à l'origine donne ($1/V_{max}$), d'où les valeurs de K_M et de V_{max} :
  - V_0 = 15.873 mg/(L.min).
  - K_M = 242.618 mg/L.

- D'après ces valeurs, on constate que la constante de Michaelis-Menten K_M a connu une augmentation remarquable par rapport à la valeur dans l'étude antérieure avec l'extrait libre, et ceci revient à la diminution d'affinité entre les molécules de NET et la peroxydase immobilisée.

IX.4. Etude de dégradation de colorant NET avec la peroxydase immobilisée dans un bioréacteur à lit fixe :

IX.4.1.Dimensionnement du bioréacteur à lit fixe :

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 du au fait qu'elle permet le conduit de 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.

L'objectif fixé par une modélisation d'un bioréacteur 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 du bioréacteur. Donc, à partir de l'étude avec la peroxydase libre et immobilisée où on a montré que la cinétique de dégradation du NET est Michaelienne qu'elle nous a permis de déterminer les paramètres cinétiques et le facteur d'efficacité η.

$$\eta = \frac{V_{immobilisée}}{V_{libre}} = 0.80$$

Le calcul du bioréacteur à lit fixe devient facile dans le but de dégrader le colorant à 99% sous les conditions initiales de débit de 100 mL/h et une concentration du NET de 50 mg/L.
Et on a obtenu après l'application numérique dans l'équation (9) que le volume du bioréacteur est 206 cm^3. Pour cela on va fixer le diamètre et on calcul la hauteur. Pour la décoloration du NET, on va comparer entre deux bioréacteurs à lit fixe à deux diamètres et hauteurs mais en gardant toujours le même volume.

- Pour Ø= 5.0 cm, H= 10.5 cm.
- Pour Ø=3.5 cm, H=21.5 cm.

IX.4.2. Etude de l'effet de débit d'alimentation sur le rendement de décoloration :

Lors de réalisation de l'expérience, le traitement des solutions dans chaque bioréacteur et à chaque débit a été réalisé en prenant les cinq premières fractions pour chaque débit étudié, chaque fraction est de volume 10 mL. Dans les conditions suivantes : [NET]=50 mg/L, $[H_2O_2]$=0.05M, pH_{opt} = 2 ; alors les rendements de décoloration du NET obtenus après chaque traitement sont présentés sur les graphes suivants (Fig. IX.9 et Fig. IX.10):

➢ **Pour le bioréacteur de Ø=3.5 cm :**

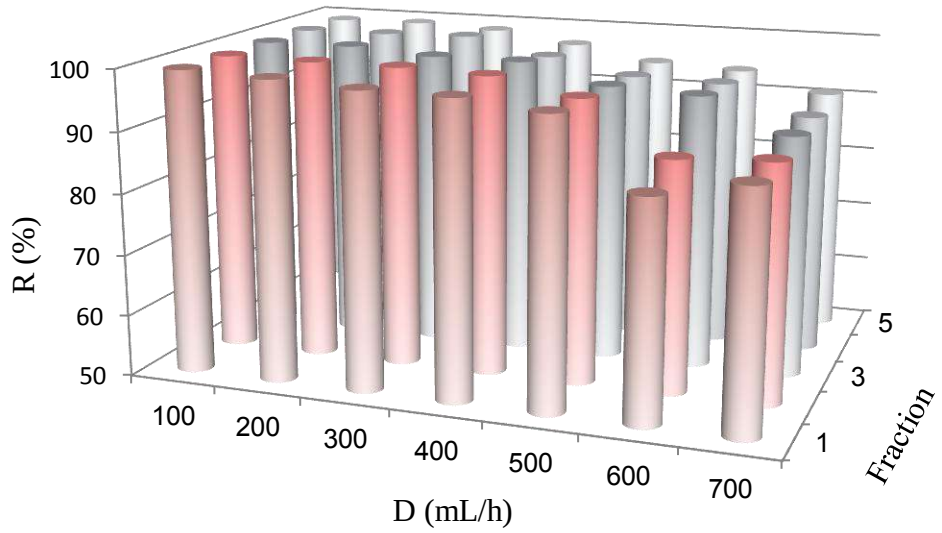


Fig. IX. 9: Variation de rendement et décoloration de NET en fonction du débit pour cinq fractions de 10 mL dans le bioréacteur de Ø=3.5 cm (NET=50 mg/L).

Le graphe (Fig. IX.9) montre que :

➢ Le rendement de décoloration est atteint une valeur maximale égale à 99.55 % pour un débit de 100 mL/h. Le rendement commence à diminuer pour des débits de 300ml/h jusqu'à il arrive à une valeur de 88.47% pour un débit de 700 mL/h.

➢ **Pour le bioréacteur de Ø= 5 cm** :

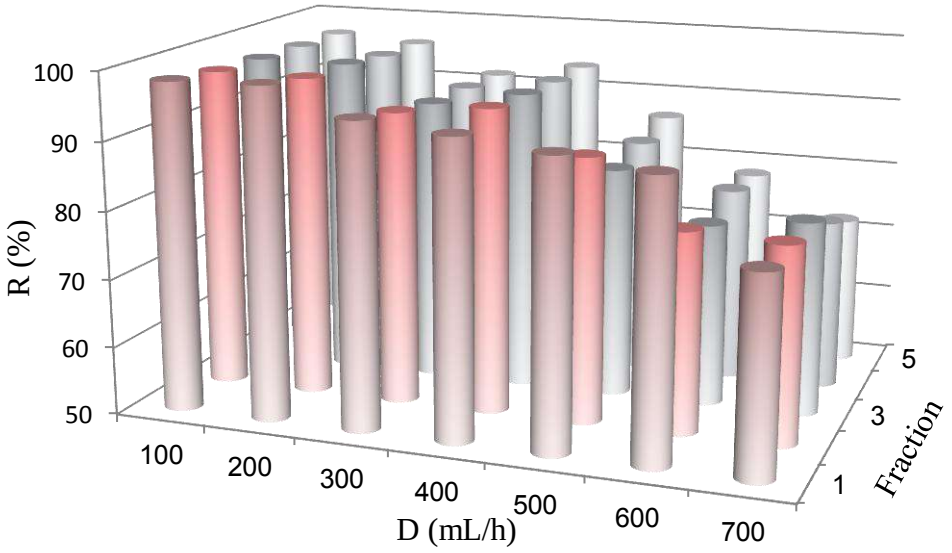


Fig. IX. 10: Variation du rendement du NET en fonction du débit pour cinq fraction de 10mL dans le bioréacteur de Ø= 5 cm ([NET]= 50mg/L).

Le graphe (Fig. IX.10) montre :

Les mêmes remarques sont constatées pour le deuxième bioréacteur. Le rendement de décoloration obtenue pour un débit de 100 mL /h est égal à 96.86%; cependant, il décroit avec l'augmentation de débit jusqu'à une valeur de 72.16 %, pour un débit de 700 mL/h.

Alors, le rendement de décoloration de NET dans les deux bioréacteurs à différentes dimensions est inversement proportionnel à l'augmentation du débit d'alimentation. Lorsqu'on augmente le débit, le temps de séjour de substrat qui diffuse le long de bioréacteur devient insuffisant pour permettre la diffusion dans les billes d'alginates et permettre la conversion totale.

Pour visualiser bien l'effet de débit d'alimentation sur le processus de décoloration dans les bioréacteurs à lit fixe de dimensions différentes, on trace les valeurs de cinquièmes fractions de deux réacteurs en fonction de débit dans le même graphe (Fig. IX.11).

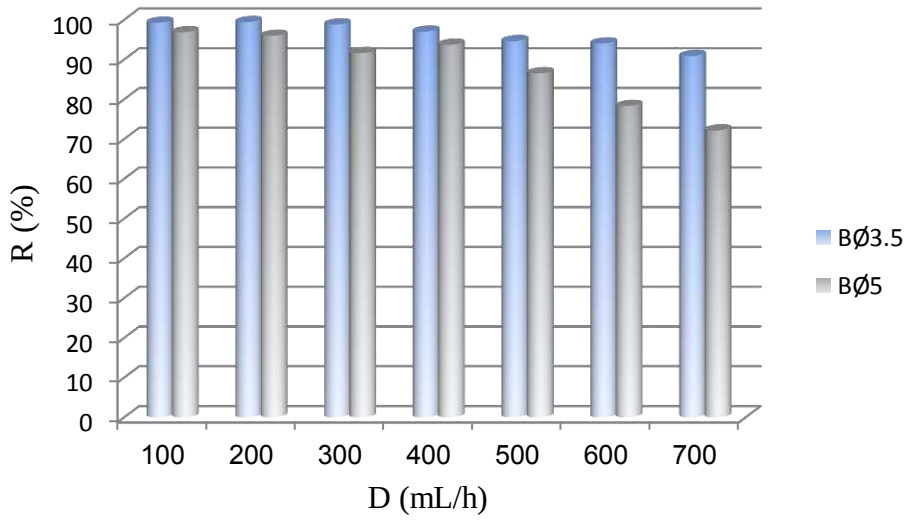


Fig. IX. 11: Effet de débit sur le rendement de décoloration du NET dans les deux bioréacteurs à lit fixe de dimensions différentes ([NET]=50mg/L).

A partir du graphe, on peut constater que les valeurs de rendement de dégradation dans le bioréacteur de Ø=3.5 cm présente une légère diminution au cours de l'augmentation de débit. La différence entre la première et la dernière valeur est juste 9%. Cependant, dans le bioréacteur de Ø= 5 cm, on remarque que les valeurs de rendement présentent une chute continue avec une différence de 25 % par rapport à la première valeur.

- En conclusion, on pourra dire que la dégradation est meilleure dans le bioréacteur de Ø= 3.5 cm. Le débit choisi pour la suite de l'étude sera 400 mL/h.

IX.4.3.Effet de la concentration du substrat (colorant) sur le rendement de décoloration :

Pour étudier l'effet de la concentration du colorant sur le rendement de décoloration dans les deux bioréacteurs, il faux tout d'abord fixer le débit à 400 mL/h, les résultats sont illustrés dans les figures suivantes (Fig. IX.12, et Fig. IX.13) :

Cas du bioréacteur à Ø = 3.5 cm :

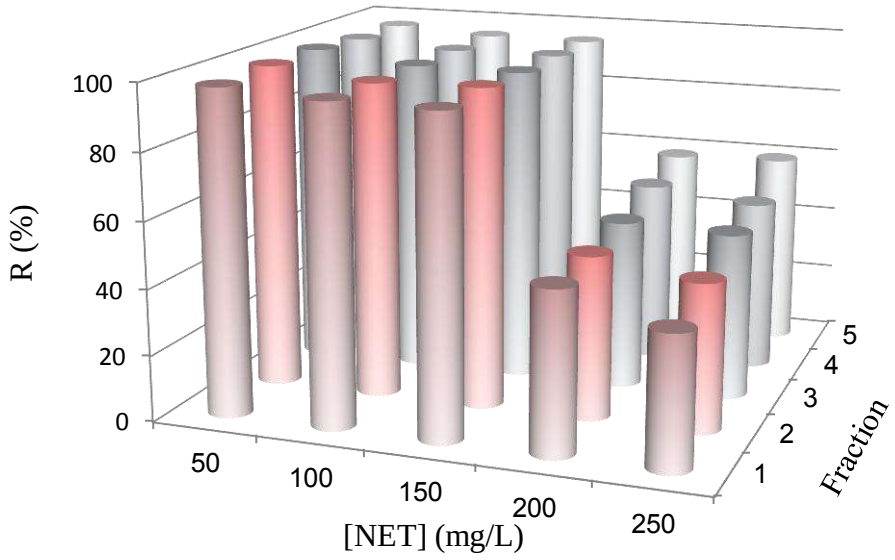


Fig. IX. 12: Variation du rendement de décoloration en fonction de la concentration du NET pour cinq fractions de 10 mL dans le bioréacteur de Ø=3.5 cm (D=400 mL/h).

Le graphe montre que :

- Le rendement de décoloration reste presque constant (95%à 97%) pour les concentrations inferieures à 150 mg/L. Si on augmente la concentration au delà de 200 mg/L, la biodégradation du colorant diminue brusquement jusqu'à 59.55% pour une concentration de 250 mg/L.

➢ **Cas du bioréacteur de Ø = 5cm :**

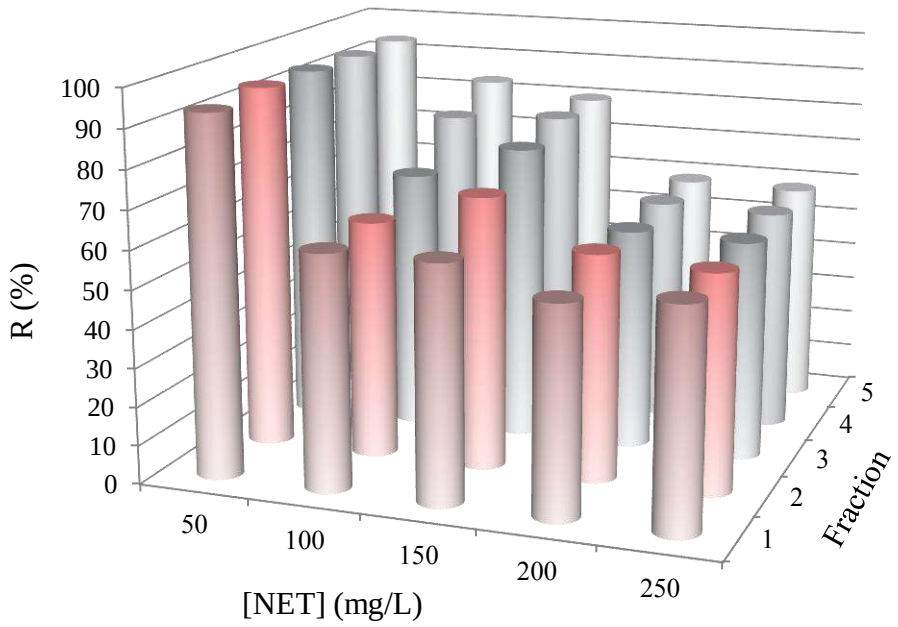


Fig. IX. 13: Variation de rendement de décoloration en fonction de la concentration du NET pour cinq fractions de 10 mL dans le bioréacteur de Ø= 5 cm (D=400mL/h).

Le graphe montre (Fig. IX.13) que :

- Le bioréacteur note une biodégradation maximale de 93.71 % pour une concentration de 50 mg/L ; cependant, lorsqu'on augmente la concentration de NET, Le rendement de décoloration diminue progressivement à une valeur de 83.38 % pour des concentrations inferieures à 150mg/L. Le rendement de décoloration chute à une valeur de 58.29 % pour des concentrations plus élevées.

D'après les deux histogrammes précédents (Fig. IX.12 et Fig. IX.13), on remarque que le rendement de décoloration est inversement proportionnel à l'augmentation de la concentration du NET. Ce phénomène est dû au colmatage des pores des billes d'alginate qui enveloppe l'enzyme par le produit de la réaction qui limite la pénétration du colorant dans les 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 suivante (Fig. IX.14) présente l'aspect de l'eau de rinçage des bioréacteurs après chaque traitement qui caractérise par la décantation de colorant au fond du bécher.



Fig. IX. 14: Aspect de l'eau de rinçage des bioréacteurs après chaque traitement de décoloration.

Pour bien visualiser l'effet de la concentration du substrat (le colorant) sur le processus de décoloration dans les bioréacteurs à lit fixe de dimensions différentes, on trace les valeurs des moyennes cinq fraction dans le cas des deux réacteurs en fonction de la concentration initiale sur le même graphe (Fig. IX.15).

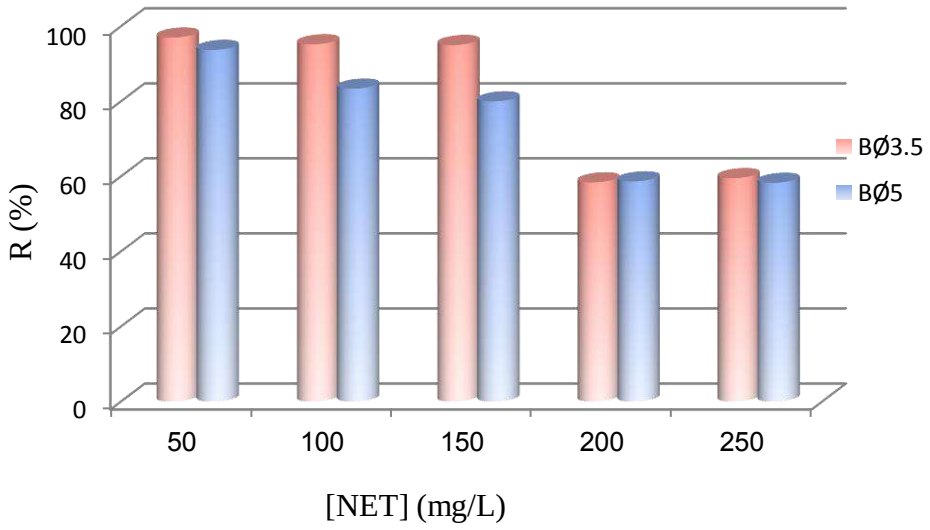


Fig. IX. 15: Effet de la concentration du colorant sur le rendement de décoloration du NET dans les deux bioréacteurs à lit fixe de dimensions différentes (D= 400 mL/h).

La figure IX.15 : montre que la meilleure dégradation est obtenue dans le bioréacteur de Ø= 3.5 cm pour toutes les concentrations réalisées. Le raison qui explique ces résultats est que le bioréacteur à lit fixe est assimilé à un réacteur chimique à écoulement piston. Qui est bien vérifié dans le cas de réacteurs de petits diamètres où l'écoulement s'approche de l'idéalité du point de vie «mélange parfait ». Comme conséquence la hauteur et le diamètre d'un réacteur

ici jouent un rôle important dans le mécanisme de la réaction, comme notre cas. Alors pour atteindre un bon marche du processus intégré du bioréacteur, il est de préférence de choisi une configuration approprié pour chaque étude.

IX.4.4. Etude de la stabilité du bioréacteur:

Notre but n'est pas seulement l'étude de dégradation d'un colorant azoïque dans un bioréacteur à lit fixe, mais aussi l'éventualité d'appliquer cette conception dans le domaine industriel. La durabilité et la réutilisation d'une procédure est l'un des critères pour qu'elle soit choisi. Alors les résultats de cette expérience sont illustrés sur les deux figures (Fig. IX.16, Fig. IX.17):

- **Cas du bioréacteur de Ø=3.5 :**

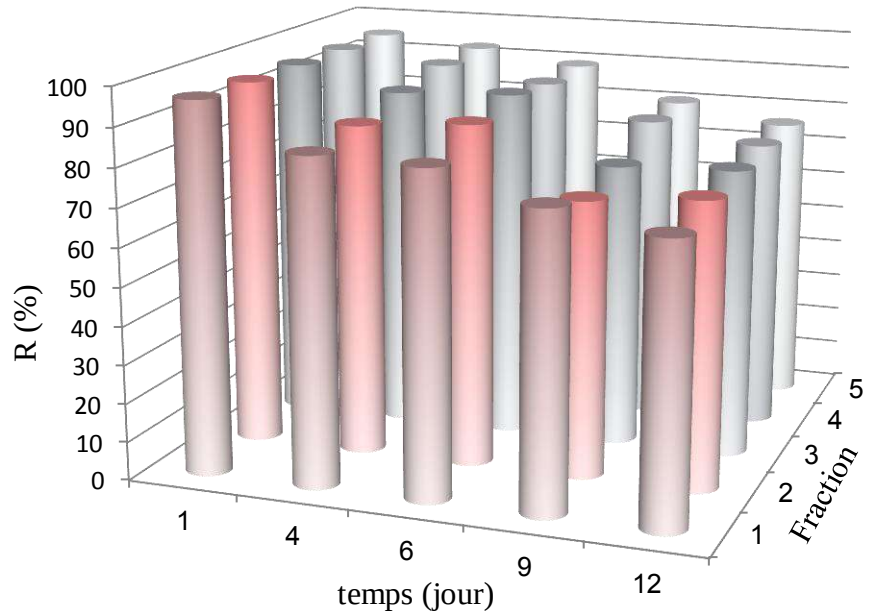


Fig. IX. 16: Variation du rendement de décoloration en fonction de temps pour cinq fractions de 10 mL dans le bioréacteur Ø=3.5 cm (D=400mL/h, [NET]=100mg/L).

Le graphe (Fig. IX.16) montre que malgré une diminution progressive du rendement en fonction de temps, on observe qu'après 10 jours, le rendement de décoloration reste acceptable et prend une valeur de 76.20 %.

➢ **Cas du bioréacteur de Ø=5 cm :**

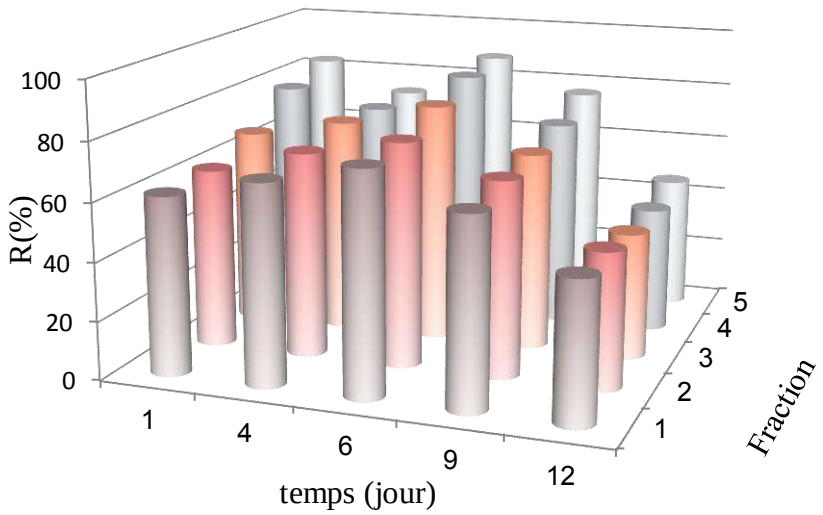


Fig. IX. 17: Variation du rendement de décoloration en fonction de temps pour cinq fractions de 10 mL dans le bioréacteur Ø=5cm (D=400mL/h, [NET]=100mg/L).

Contrairement au résultat obtenu pour le bioréacteur de Ø= 3.5cm; Le graphe (Fig. IX.17) montre que le rendement de décoloration dans ce bioréacteur est augmente pour les cinq premiers jours jusqu'à une valeur de 88.25%; mais, il recommence à diminuer progressivement en fonction du temps.

Pour visualiser l'effet de temps sur le rendement de décoloration de NET dans les deux bioréacteurs, on trace les valeurs moyennes des cinq fractions pour les deux bioréacteurs en fonction de temps sur le même graphe (Fig. IX.18).

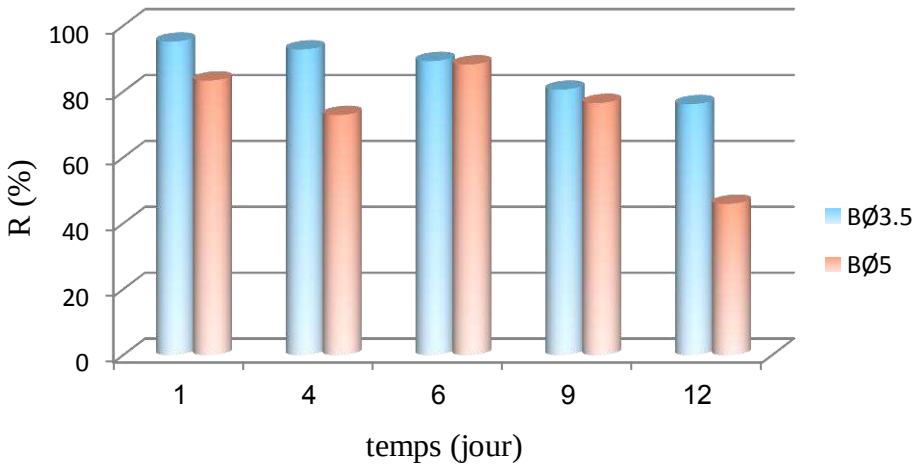


Fig. IX.18: Effet du temps sur le rendement de décoloration du NET dans les deux bioréacteurs à lit fixe de dimensions différentes (D= 400 mL/h, [NET]=100mg/L).

Le graphe (Fig. IX.18) montre que la biodégradabilité dans le bioréacteur de Ø=3.5 cm reste relativement constante par rapport au bioréacteur de Ø=5 cm durant 10 jours d'opération.

Conclusion Générale

CONCLUSION GENERALE

Tout au long de cette étude, nous avons traité un colorant industriel par un procédé enzymatique qui met en œuvre la peroxydase extraite à partir d'une culture locale de navet blanc "*Brassica Rapa*". 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 constantes pour faire la conception et la réalisation d'un bioréacteur à lit fixe.

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 possédant une activité spécifique relativement élevée de 10.07 UI/mg et caractérisé par une concentration en protéine 5 fois plus inférieur que celle d'extrait brut; en plus cette technique a permet de conserver l'extraits enzymatique pour une durée qui dépasse deux mois.

L'étude cinétique de décoloration de NET a permis de déterminer le temps nécessaire pour le déroulement de la réaction estimée à 10 minutes seulement. Par ailleurs, Les cinétiques de dégradation ont été établies dans les deux cas "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. 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 diamètre de réacteur)sur le rendement de dégradation. Le rendement maximal (95%) est obtenu dans le cas de bioréacteur de diamètre 3.5cm pour une concentration et débit d'alimentation de 100 mg/L et 400 mL/h respectivement pour une durée de fonctionnement stable de 10 jours

En perspective le présent travail a permis d'avoir une large idée sur l'utilisation de la peroxydase du navet dans la dégradation des colorants azoïques qui existent dans les effluents industriels. Il est donc intéressent de poursuivre l'étude en traitant les points suivants :

- Utilisation des techniques biochimiques plus avancées, pour caractériser la peroxydase du navet, et précisément pour identifier les acides aminés incluent dans son site catalytique.

- Extrapolation de ce procédé à grande échelle, peut être une solution très intéressante, du point de vue économique pour ce type d'effluents de rejets, surtout pour un pays très riche en tous types de navet comme l'Algérie.
- Utilisation d'autres supports d'immobilisation pour minimiser les limitations diffusionnelles.
- 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.

Annexes

ANNEXE I : EXISTENCE DE LA PEROXYDASE DANS LE NAVET.

La peroxydase des plantes existe dans plusieurs légumes et fruits (radis, raifort, navet, pomme de terre, pomme, champignons…etc.). Pour notre étude, il faut choisir des organes à chair claire pour faciliter la visualisation de la réaction colorée, dans ce cas on choisit le navet, car sa peroxydase présente le meilleur rapport entre la facilité de préparation et de conservation. On fait cette expérience pour montrer l'existence de la peroxydase dans le navet:

Procédure :

Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

- Dans une fiole de 50 mL introduire :
  - 1 mL de phénol (0.1M).
  - 1 mL d' H_2O_2 (0.1M).
  - 1 mL de 4- amino-antipyrine (0.01M).
  - compléter avec une solution tampon pH6 jusqu'à le trait de jauge.

- Couper deux tranches de navet à tester, les essorer avec du papier-essuie et les disposer à plat. Recouvrir entièrement une des deux tranches avec du réactif en le versant goutte à goutte et l'autre tranche avec de l'eau pour servir de témoin. Laisser la coloration se développer (quelques minutes à une demi-heure).

Résultat :



Avec de l'eau Avec le réactif

Fig. A. 1: mise en évidence de l'activité catalytique de la peroxydase dans le navet.

ANNEXE II : COURBE D'ETALONNAGE DU PEROXYDE D'HYDROGENE

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% en 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 pH6

• 1mL d' H_2O_2 de différentes concentrations.

• 1mL de 4-Amino-antipyrine à0.001M

• 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 **(Fig. A.2)**:

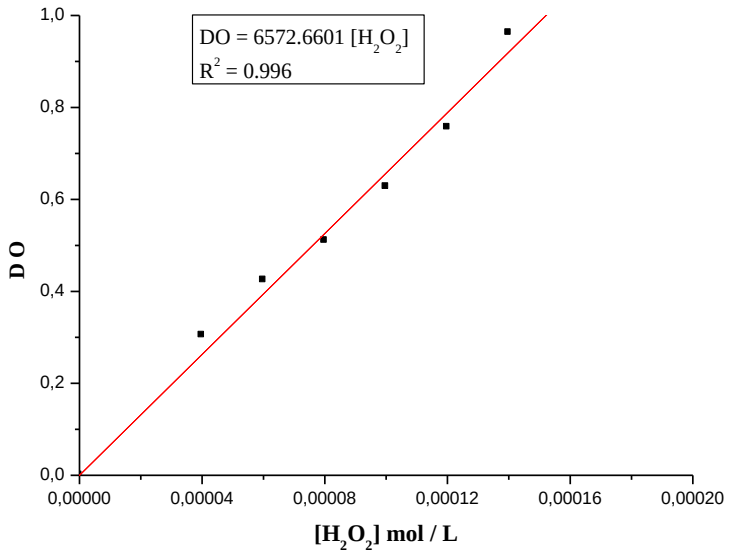


Fig. A. 2: Courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène.

ANNEXE III : DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD.

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique basé sur le changement d'absorbance qui se manifestant par le changement de la couleur de bleu de Comassie après l'attachement avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines.

La forme anionique (liée) du colorant est bleu, et possède en spectre d'absorption maximal estimé à 595 nm, les formes cationiques (libre) du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant liée.

Procédure :

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford se fait selon le protocole suivant :

- Prendre 7 tubes, dans chaque un introduire :
  - 0.25 mL NaOH (1 M).
  - 5 mL de réactif de Bradford.
- Pour les cinq premiers tubes à essais, ajouter 0.1 mL de l'albumine à différentes concentrations [0-100] (mg/L) avec un pas de 20 mg/L. et pour les 2 autres tubes à essais, introduire dans le premier 0.1 mL d'EEPP et dans le deuxième introduire le même volume de EEB.
- Agiter puis laisser les tubes 10 min pour développer la coloration
- Mesurer l'absorbance à 595 nm.

La représentation graphique de DO en fonction de concentration d'albumine est illustrée dans la figure suivante (**Fig. A.3) :**

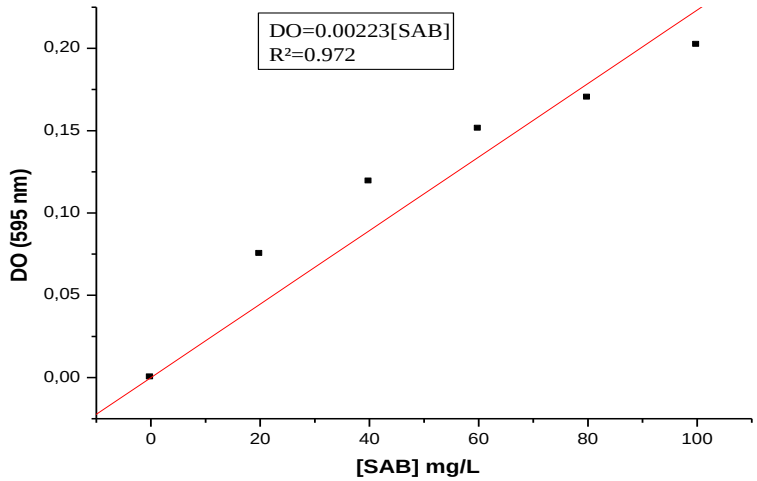


Fig. A. 3: Courbe d'étalonnage de la protéine SAB suivant la méthode de Bradford.

ANNEXE IV : LA COURBE D'ETALONNAGE DU COLORANT (NET).

Pour pouvoir transférer la disparition de la couleur au cours de dégradation du colorant NET en fonction de temps, il est nécessaire de tracer la courbe d'étalonnage de notre colorant et calculer le coefficient d'extinction.

Les solutions des colorants utilisés sont préparées en tenant compte de leurs solubilités. Pour toutes les composés étudiés, nous avons utilisés la même méthode, qui consiste d'abord à préparer une solution mère du colorant de concentration donnée de ([NET]=100mg/L) et à partir de laquelle nous préparons par dilutions successives, une série de solutions de concentrations bien déterminées de 10 mg/L jusqu'à 80 mg/L avec une pas de 10 mg/L. en utilisant la solution tampon pH 2.0 puisque à ce pH la dégradation est au maximum. La méthode d'analyse utilisée est la spectrophotométrie UV-visible a une longueur d'onde **(λ_{max})** est égale 513nm. Le graphe qui représente la variation des absorbances en fonction de la concentration du colorant NET est illustré ci-dessous **(Fig. A.4)**.

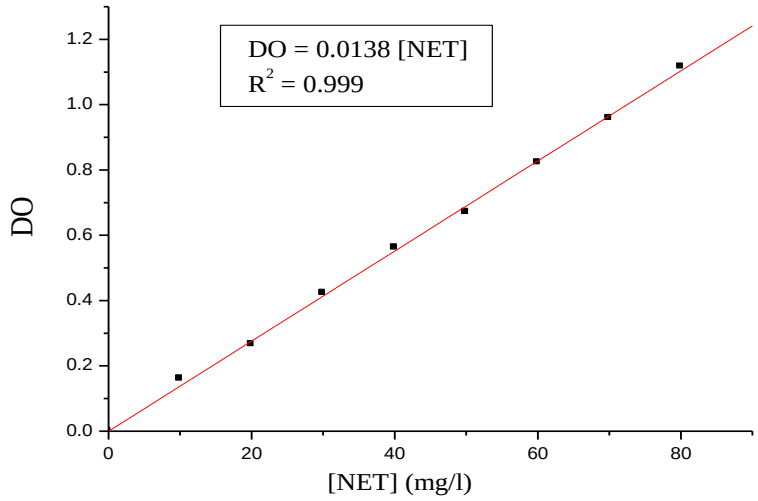


Fig. A. 4: Courbe d'étalonnage du colorant NET.

Références bibliographiques.

Références bibliographiques

[1] **Anjaneyulu1, Y. Sreedhara Chary, N. et Samuel Suman, D.:** Decolourization of industrial effluents: available methods and emerging technologies, Review in Environmental Science and Bio/Technology., 4, 245–273 (2005).

[2] **Zille, A.** : Laccase Réactions for Textile Applications. Thèse de doctorat Université Minho Escola de Engenharia Italie. 4-19 (2005).

[3] **Sato, T. Tosa, T. Seiyaku, T. et Lid, C.** : Enzymes immobilisation méthodes, Osaka. Japon (2006).

[4] **Alton, A. et Theil, W.**: peroxydase formula (2005).

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

[6] **Hemsas, S.**: contribution à l'étude de la décoloration des eaux sur grignons d'olives valorisés : Etude dynamique. Thèse de magistère .Université M' Hamed Bougara Boumerdès. (2007).

[7] **Herbst, W. et Hunger, C.** : Industriel Organique pigment: production, propretés, applications, DruKhans Darmstadt Gmbh (2004).

[8] Environmental Guidelines for Dye Manufacturing, Multilateral Investment Guarantee Agency, www.miga. org/documents/DyeManufacturing.pdf.

[9] **Fues, D.**: les colorants textiles, centre de recherches textiles de Mulhouse., 11, 1-12 (2003).

[10] **Shore, J.**: les colorants chimiques, 130 ans de développement., 1194, 901-903 (1988) et 1194, 1179 (1988).

[11] **DULAK, C.**: Les Matières colorantes : évolutions et perspectives dans l'industrie textile., 1215, 78-84 (1990)

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

[13] **Moncada, C. Palmer, R.M. et Higgs, E.A.**: les colorants textiles, Pharmacol. Revu. 43, 109-142 (1991).

[14] **Pagga, U. ET Brown, D.**: les colorant, Chemosphere., 15, 479 - 491 (1986).

[15] **Christie, R. M.** Colour chemistry: The royal society of chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton road, Cambridge.CB40WF, UK (2001).

[16] **Mansour, H. Boughzala, O. Dridic, D. Barilliera, D. Chekir-Ghedirab, L et Mosrati R.** : Les colorants textiles sources de contamination de l'eau : criblage de la toxicité et des méthodes de traitement, Journal of Water Science. 24, 209-238 (2011).

[17] **Zawlotzki Guivarch, E.** : Traitement des polluants organiques en milieu aqueux par Procédé électrochimique d'oxydation avancée, électro-fenton, application à la minéralisation des colorants synthétiques, thèse de Doctorat, Université de Marne- La- Vallée. (2004).

[18] **Qayyum, H.** Peroxydase mediate decolorization and remediation of waste water containing industrial days, Reviews Environmental Science Biotechnologies DOI., 10.1007/s11157-009-9184-9 (2009).

[19] **Crini, G. et Badot, P-M.**: Traitement et épuration des eaux industrielles polluées: Procédés membranaires, bioadsorption et oxydation chimique, Presse universitaire de Franche-Comté., 349, 29 (2007).

[20] **BARKA, N.**: L'élimination des colorants de synthèse par adsorption sur un phosphate naturel et par dégradation photo catalytique sur TiO2 supporté, thèse de doctorat, université IBNE ZOHR, Maroc (2008).

[21] **Regalado ,C. Garcia-Almendarez, E.B. et Duarte-Vazquez, A.M.**: Biotechnological application of peroxydase, Phytochemistry Reviews., 115, 1177–1186 (2009).

[22] **Souza, S.G. Forgiarini, E.**: Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxydase (HRP), Journal of Hazardous Materials., 147, 1073–1078 (2007).

[23] **Regalado, C. Garcia-Almendarez, A.M. et Duarte-Vazquez, E.B.**: Biotechnological applications of peroxydase, Phytochemistry Reviews., 3,243–256 (2004).

[24] **Fabiano, S.** : application a la réalisation de biocapteurs ampérométriques pour le dosage du glucose et des composés phénoliques, thèse du magistère, Université Claude Bernard, France. (2002).

[25] **Weilj, H.** Biochimie générale ; 10 ed, Dunod, Paris, (2001).

[26] **Voet, D et Voet, J. G.** : Biochimie. 2ed. Dunod, Paris. (2001).

[27] **Stryer L.**: Biochemistry.2 ed. W. H. Freeman.(1981).

[28] **Augère, B.** : les enzymes biocatalyseurs protéiques. 2ed. Elipe édition marketing SA. (2001).

[29] **Jamin, M. Saks, V.** : Cinétique enzymatique. 2 ed. Porthland press, Ltd, London. (2004).

[30] **Bensegueni, A. et Chikhi, A.** : biochimie générale : cours et exercices corrigés, partie II.2 ed. Citra copy. (2005). P18-19.

[31] **Calvet, R.** : Le sol : propriétés et fonctions. Constitution, structure, phénomènes aux interférences.2 ed. Edition France agricole. (2003).

[32] **Guilloton, M. et Quintard, B.** : biochimie. 2 ed. Paris Dunod. (1999).

[33] **Serge, W. et Méhul, P.** : toute la biochimie.3 ed. Dunad. Paris. (2004) .p 137.

[34] **Genard, S. Bouchy, M. Foncant, J .F. et Orfan, Z.** : cinétique et catalyse.4 ed. Technique et documentation. (1996) .p 309

[35] **Moussard, Ch.** : Biochimie structurale et métabolique: Médecine, Pharmacie, Sciences. Edition de Boek et Larcier S.A. (2002).

[36] **Reginald, H.G. et Gresham, C.M.** : Biochimie ; 2e éd américaine ; De Boeck universités, (2000).

[37] **Sumitra, D. Rene Christina, L. et Sriramulu Rajaram, Y. R.** : Enzyme immobilization: an overview on techniques and support matériels, Biotechnology., 42, 6406-6436 (2013).

[38] **Beatriz, M. Brena. ET Francisco, B.V.**: immobilization of enzymes, p 1-17. J. M. Guisan. 2ed, methods in biotechnology: immobilization of enzymes and cells, Humana press (1995).

[39] **Seung wook, K.**: Development of Enzyme Immobilization Technique, Laboratory of Bioprocess Engineering .Department of chemical and Biological engineering. Korea University (2007).

[40] **Cynthia, S. ET Shelley, D.M.:** enzyme immobilization in biotechnology, recent parents on engineering., 2, 195-200 (2008).

[41] **Goel, M.K.**: immobilized enzymes, Biotech-Environ. (1994).

[42] **D'souza, S.F.**: immobilized enzyme in bioprocess, Microbial-biotechnol., 15, 114-132 (1999).

[43] **Barhoumi, H.** : Elaboration et caractérisation de nouvelles membranes enzymatiques pour application "biocapteur" en hémodialyse rénale, thèse de doctorat, université de Monastir, (2006).

[44] **Guisan, J. M.**: Immobilization of enzymes and cells, Humana Press Inc. 999 RiverviewDrive, suite 208 Totawa, New Jersey 07512, (2006).

[45] **Guisan, J.M.:** Immobilization of enzymes and cells; Humana Press Inc ; Totowa, (2006).

[46] **Shah, V.**: Emerging Environmental Technologies, Volume 2, Editor Vishah shah. USA; (2010).

[47] http://www.pierron.fr/pi/index.a4d.

[48] **Torres, E. Bustos-Jaimes, I.**: Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants**,** Applied Catalysis B: Environmental., 46, 1–15 (2003).

[49] **Leclère, J. Orgiazzi, J. Rouesset, B. Schlienger, J.L. et Wémeau, J.L.** : La thyroïde: des concepts à la pratique clinique, Edition scientifique et médicales Elsevier SAS., (2001).

[50] Www. perso.orange.fr/Jean-Jacques. Auclair/exaosite/peroxydase html.

[51] www.biotech-ecolo.net 'Théorique et application pratiques', Agadir, (2006).

[52] http://www.didier-pol.net/1peroxydase.html.

[53] **Mohsina, H. Khalil-ur-Rehman.**: Potential application of peroxydase, Food chemistry., 115, 1177-1188(2009).

[54] **Conesa A, Peter J, Punt, Cees A.M.J.J. ET Van den Hondel**.: Fungal peroxydase: molecular aspects and applications, journal of Biotechnology., 93, 143-158 (2002).

[55] **Peter, J. et O'Brien.**: la peroxydase, Chemico-biological Interactions., 129, 113-139 (2000).

[56] **Freire, R. S. Pessoa, C. A. Mello, L. D. ET Kubota, L.T.**: Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity, Journal of the Brazilian Chemical Society Print version ISSN., 14, 0103-5053 (2003).

[57] **Julien, p.** : analyse théorique de bioréacteurs et d'implants utilisés en génie tissulaire osseux et cartilagineux, thèse de doctorat, université Paris XII – val de Marne, France. (2004).

[58] **Benameur Villain, S.** : Conception et étude d'un réacteur enzymatique a membrane fonctionnant en milieu supercritique : application à la synthèse enzymatique d'esters, thèse de doctorat, École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier. (2012).

[59] **RIBA, J-P. :** Réacteurs enzymatiques et fermenteurs**,** Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés, F3600.

[60] **Schmid, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts ET Witholt, B.**: Industrial biocatalysis today and tomorrow, Nature., 409, 258-266 (2001).

[61] **Hartmeier, H**.: immobilized biocatalysts; reactors for immobilized biocatalysts, Springer- Verlag Berlin Heidelberg., 72, 81(1988).

[62] **Balcao, V.M. Paiva, A.L. ET Xavier Malcata, F.**: Bioreactors with immobilized lipases: State of the art, Enzyme and Microbial Technology., 18, 392-416. (1996)

[63] **Engasser, j. m.:** factors influencing the performance of enzymatic reactors. Inenzymic and enzymic catalysis, Ellis Horwood., 174-202 (1980).

[64] **Laudani, C.G. Habulin, M. Knez, Z. Porta, G.D. ET Reverchon, D**.: Immobilized lipase mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench-scale packed-bed reactor study, The Journal of Supercritical Fluids., 41, 74-81(2007).

[65] **Rekuc, A. Jastrzembska, B. Liesiene, J. ET Bryjak, J**.: Comparative studies on immobilized lactase behavior in packed-bed and batch reactors, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 57,216-223. (2009)**.**

[66] **Ahmedi, A.:** étude de dégradation des colorants azoïques par la peroxydase libre et immobilisée, thèse de magistère, université de Médéa. (2011).

[67] **Bradford, M.M**.: A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem., 72, 248–54. (1976).