REPUBLIQUE ALGERIENNE POPULAIRE ET DEMOCRATIQUE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DR. YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
Département de Génie Des Procédés et Environnement



Mémoire de Fin d'Etudes

En vue d'obtention du Diplôme de Master en Génie Des Procédés
Option : Bioprocédés Pharmaceutiques

Thème

Dégradation des colorants azoïques dans un bioréacteur enzymatique à peroxydase immobilisée

Proposé et dirigé par :

Pr. ABOUSSAOUD Mahmoud
Dr. AHMEDI Afaf

Réalisé par :

OULD TERKI Amina
BENRACHED Hassina

2015-2016

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 :*

***A**u 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.*

***I**l me tient particulièrement à cœur de remercier ma promotrice, **Mme. AHMEDI Afaf**, Maitre assistant 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**ous exprimons nos profonds remerciements à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation, **M. TASIST Amina**, **Mr**. **Bensedka Abed kadir** , **Mr. LAIDI maamar**, **Melle. GUMANA Nacera.

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

***C**e projet a été réalisé au niveau de laboratoire de Hall technologie de Médéa. Je suis très reconnaissante à Mr Le Directeur du Hall technologie, pour nous avoir accueillis dans le laboratoire.*

***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 remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir

Donné la force et le courage et la volonté

pour Accomplir ce modeste travail.

Je dédie ce travail à mes trésors, à ceux qui

Ont été la cause de ma présence dans ce monde,

À ceux qui m'ont donnés l'amour et l'affections et

Toutes Leurs vies pour ma voir satisfaite et

Gagnante, à l'espoir de mon existence ma chère mère,

Et l'âme de ma vie mon cher père, que dieu Puisse

M'aider à les honorer, les combler.

A mes frères : Ayoub, Hocine

A ma sœur : Ahlem

A tout ma famille.

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

Ma binôme Amina qui a partagé avec moi les moments

Difficiles de ce travail et à sa famille

A toute la promotion de bioprocédés

2015-2016

Hassina

Dédicace

Je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir

Donné la force et le courage et la volonté pour

Accomplir ce modeste travail.

Je dédie ce travail à mes trésors, à ceux qui

Ont été la cause de ma présence dans ce monde,

À ceux qui m'ont donnés l'amour et l'affections et

Toutes Leurs vies pour ma voir satisfaite et

Gagnante, à l'espoir de mon existence ma chère mère,

Et l'âme de ma vie mon cher père, que dieu

Puisse m'aider à les honorer, les combler.

A mes frères et mes sœurs.

A tout ma famille

Ould terki

A l'éspoir de la vie mon fils Mohamed el-amine.

A mes amies : Safia, Aicha, Asma,

A tout la promotion de bioprocédés.

2015-2016

Amina

الملخص

يندرج هذا العمل في إطار دراسة فعالية و استعمال إنزيم البيروكسيداز النباتي المستخرج والمنقى من اللفت الأبيض" براسيكا رابا" في التحلل البيولوجي المستمر لصبغة لأزو (أسود إريوكروم ت) في اثنين من المفاعلات الحيوية : مفاعل حيوي السرير الثابت ومفاعل حيوي ذات تحريك ميكانيكي وجرى حساب مفاعل حيوي على أساس من الظروف المثلى والمعلمات الحركية حددت بالفعل في وقت سابق أثناء الدراسة مع الانزيم الحر والمثبت.

دراسة تأثير بعض العوامل كالتدفق ,تركيز الملون واستمرارية الطريقة قد درست و تحصلنا على أن المفاعل الحيوي ذو القطر 3.5سم و الارتفاع 21سم أعطى مردود إزالة الصبغة بنسبة 99 % وقد تحقق مع معدل التدفق ب 200 مل /سا وتركيز 50 مغ/ل أما بالنسبة للمفاعل الحيوي ذات تحريك ميكانيكي فإن نتائج مردود إزالة الصبغة كانت 90 % في نفس شروط العمل .لاستمرارية الطريقة برهنت بعد مدة 5 ايام إزالة أكثر من 53 % من الصبغة بالنسبة للمفاعل الحيوي ذات تحريك ميكانيكي فمردود إزالة الصبغة قد انخفض إلى 43 % .

الكلمات المفتاحية : صبغ أزو , 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 extraite et purifiée à partir du navet blanc "*Brassica rapa*" dans la biodégradation en mode continu d'un colorant azoïque "Noir Eriochrome T" (NET) dans deux types de bioréacteurs : bioréacteur à lit fixe et bioréacteur mécaniquement agité. Le calcul du bioréacteur a été réalisé sur la base des conditions optimales et des paramètres cinétiques déjà déterminées auparavant lors de l'étude avec l'enzyme libre et immobilisée.

Les effets de certains facteurs comme le débit, la concentration du colorant et la durée de fonctionnement du bioréacteur ont été étudiés. Les résultats ont montré que pour le bioréacteur à lit fixe de diamètre 3.5 cm et une hauteur de 21cm, une décoloration de 99 % est atteinte avec un débit de 200 ml/h et une concentration de 50mg/L. Dans le cas du bioréacteur mécaniquement agité, le rendement de décoloration était de 90% sous les mêmes conditions opératoires. L'étude de la stabilité de fonctionnement des deux bioréacteurs a montré qu'après une durée de 5 jours une performance de décoloration de plus de 53% est conservée pour le bioréacteur à lit fixe alors que pour le bioréacteur mécaniquement agité le rendement de décoloration a diminué jusqu'à 43%.

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

Abstract

This work aims at studying the effectiveness of the use of the enzyme plant Peroxidase extracted and purified from white turnip "*Brassica rapa*" in the biodégradation in continuos mode of an azo dye "Eriochrome Black T" (NET) in two types of bioreactors': fixed bed bioreactor and bioreactor agitated mechanically. The calculation of the bioreactor was carried out on the basis of optimum conditions and kinetic parameters already determined earlier during the study with the free and immobilized enzyme. The effects of factors such as flow, dye concentration and bioreactor run time were studied.

The results showed that for the bioreactor fixed bed diameter 3.5 cm and a High of 21cm, a 99% bleaching is achieved at a rate of 200 ml / h and a concentration of 50mg / L. In the case of mechanically agitated bioreactor, bleaching yield was 90% under the same operating conditions. The study of the stability of functioning of the two bioreactors showed that after a period of five days a bleaching performance of over 53% is retained to the fixed bed bioreactor, while the bioreactor for mechanically agitated bleaching performance has decreased to 43%.

Keywords: azo dye, Peroxidase, immobilized, bioreactor, bleaching performance.

Table des matières

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

Introduction générale 1

Partie A : Synthèse bibliographique

I. GÉNÉRALITÉS SUR LES COLORANTS 4
I.1. Introduction : 4
I.2. Historique des colorants 4
I.3. Définition du colorant : 5
I.4. Utilisation des colorants 6
I.5. Classification des colorants 6
I.5.1. Classification technologique ou (appellation usuelle) 6
I.5.2. Classification technique 7
I.5.3. Classification chimique 8
I.5.4. Classification tinctoriale 11
II. LES COLORANTS AZOÏQUES : 14
II.1. Historique : 14
II.2. Définition et structure chimique : 14
II.3. Principales familles des colorants azoïques : 15
II.4. Pollution industrielle par les colorants azoïques 15
II.5. Impacts environnementaux des colorants azoïques : 17
II.5.1. Dangers à court terme: 18
II.5.2. Dangers à long terme : 18
II.6. Méthodes de traitement des effluents colorés : 19
II.6.1. Méthodes physiques de traitement 19
II.6.2. Méthodes chimiques de traitement 20

II.6.3. Méthodes physico- chimiques de traitement des textiles 23
II.6.4. Méthodes biologiques de traitement: 24
II.6.5. Résumé comparatif des procédés et analyse critique 25
III. LES ENZYMES 27
III.1. Définition et propriétés : 27
III.2. Nomenclature et classifications: 28
III.3. Cinétique enzymatique à un seul substrat : 29
III.3.1. Cinétique de Michaelis-Menten : 29
III.3.2. Détermination des constantes cinétiques : 31
III.4. Cinétique enzymatique à deux substrats 32
III.4.1. Réactions séquentielles : 32
III.4.2. Réactions ping-pong : 32
III.5. Unités d'activité enzymatique : 33
III.6. Effecteurs influençant l'activité enzymatique : 34
III.6.1. Effecteurs physicochimiques : 34
III.6.2. Effecteurs chimiques : 34
IV. Immobilisation des enzymes.....35
IV.1. Définition de l'immobilisation: 35
IV.2. Techniques d'immobilisation : 35
IV.2.1. Immobilisation par inclusion: 35
IV.2.2. Immobilisation par liaison : 36
IV.3. Propriétés des enzymes immobilisées : 38
IV.3.1. Propriétés physico-chimiques : 39
IV.3.2. Propriétés cinétiques : 39
IV.4. Choix du support : 39
V. LES PEROXYDASES 40
V.1. Généralités : 40
V.2. Classification : 41
V.3. Cycle catalytique de peroxydase : 41
V.4. Applications industrielles: 42
V.4.1. Décoloration des colorants synthétiques: 42
V.4.2. Traitement des composés phénolique : 42
V.4.3. Synthèse organique : 43

V.4.4. Biocapteurs à base de la peroxydase : 43
V.4.5. Application pour analyse et diagnostique : 43
VI. Bioréacteurs ou Réacteurs Enzymatiques 44
VI.1. Définition : 44
VI.2. Principe de choix de bioréacteur 44
VI.3. Principe de dimensionnement de bioréacteurs 44
VI.4. Principaux types de bioréacteurs : 44
VI.4.1. Fonctionnement discontinus (Bioréacteur agitée) 45
VI.4.2. Fonctionnement continus 45
VI.5. Calcul de réacteur à lit fixe : 49
VI.6. Calcul de bioréacteur mécaniquement agité : 50

Partie B : Etude expérimentale

VII. PRODUITS ET MATÉRIEL.....54
VII.1. Produits utilisés : 54
VII.1.1. Source de la peroxydase : 54
VII.1.2. Substrats de la peroxydase : 54
VII.1.3. Réactifs utilisés dans le test standard de mesure de l'activité enzymatique : 55
VII.1.4. Solvant de purification : 56
VII.1.5. Produits utilisés dans le dosage des protéines : 56
VII.1.6. Produits utilisés dans l'immobilisation : 56
VII.1.7. Solutions tampons : 56
VII.2. Matériel utilisé 56
VIII. EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA PEROXYDASE : 57
VIII.1. Extraction de la peroxydase : 57
VIII.2. Purification de la peroxydase par précipitation à l'acétone: 58
VIII.3. Mesure de l'activité enzymatique : 59
VIII.4. Calcul de l'activité enzymatique des deux extraits enzymatiques 60
VIII.5. Dosage de la quantité de protéines : 61
VIII.5.1. Comparaison entre les deux extraits EEB, EEPP : 61
IX. ETUDE DE LA DEGRADATION DE COLORANT AVEC LA PEROXYDASE IMMOBILISEE : 63

IX.1. Préparation des billes à peroxydase immobilisée : 63
IX.2. Caractérisation des billes : 65
X. ETUDE DE LA DEGRADATION ENZYMATIQUE EN CONTINU DU NET DANS LES BIOREACTEURS.....65
X.1. Calcul et conception des bioréacteurs 65
X.1.1. Calcul du bioréacteur à lit fixe :..... 65
X.1.2. Dispositif de bioréacteur à lit fixe : 66
X.1.3. Calcul du bioréacteur mécaniquement agité 66
XI. EFFET DES PARAMETRES OPERATOIRES SUR LA DECOLORATION DU NET DES LES BIOREACTEURS ENZYMATIQUES :.....68
XI.1. Méthodes de décoloration du NET dans les bioréacteurs enzymatiques 68
XI.1.1. Effet de débit d'alimentation sur la décoloration du NET : 68
XI.1.2. Effet de la concentration du substrat (colorant) sur le rendement de décoloration 69
XI.1.3. Etude de la stabilité du bioréacteur: 69
XI.2. Résultats de décoloration du NET dans les bioréacteurs enzymatiques 69
XI.2.1. Etude de l'effet de débit d'alimentation 70
XI.2.2. Etude de l'effet de la concentration du colorant..... 72
XI.2.3. Etude la stabilité du bioréacteur 75
XI.3 Simulation du fonctionnement des deux bioréacteurs ……..…...77
Conlusion générale..... . Erreur ! Signet non défini.

Liste des figures

Partie A : Synthèse bibliographique

Figure I-1 : Structure chimique de la molécule anthraquinone 8
Figure I-2 : Structure chimique du Jaune 2 (colorant diphénylamine) 9
Figure I-3 : Structure chimique du Jaune 11 colorants (polyméthiniques) 9
Figure I-4: Structure de phtalocyanine. Exemple : phtalocyanine de cuivre 10
Figure I-5 : Structure chimique de l'indigo 10
Figure I-6 : Structure moléculaire d'un colorant xanthène 11
Figure I-7 : Structure moléculaire d'un colorant nitré et nitrosé 11
Figure I-8 : Structure de base des colorants réactifs 12
Figure I-9 : Comportement du colorant à mordant en présence du textile 13
Figure II-1: Structure chimique générale des colorants azoïques 15
Figure II-2 : Structures chimiques de quelques amines aromatiques toxiques 17
Figure II-3 : Conséquences de la bioaccumulation après déversement d'un colorant azoïque dans un cours d'eau 19
Figure III-1: Représentation graphique d'une cinétique Michaelienne 31
Figure III-2: Représentation graphique de linéarisation de l'équation de Michaelis –Menten, A : selon Lineweaver-Burk, B : selon Eadie-Hosftee..... 32
Figure III-3 : Différents mécanismes de réactions enzymatiques à deux substrats 33
Figure III-4 : Effets de température (A) et de pH (B), sur l'activité enzymatique 34
Figure IV-1 : Classification des différentes techniques d'immobilisation 35
Figure IV-2 : Techniques d'immobilisation par inclusion 36
Figure IV-3 : Techniques d'immobilisation par adsorption 37
Figure IV-4: Modes de fixation non covalente à un support 37
Figure IV-5 : liaison covalente entre l'enzyme et le support 37
Figure IV-6 : Immobilisation des enzymes par réticulation 38
Figure IV-7: Le principe de la réticulation avec le glutaraldéhyde 38
Figure V-1: Ferriprotoporphyrine IX ou hème b. (A, B, C, D) représentent les quatre noyaux pyrroles 41
Figure V-2 : Mécanisme réactionnel de la peroxydase 42
Figure VI-1: Bioréacteur de fonctionnement discontinu avec l'enzyme immobilisée (bioréacteur agité) 45

Figure VI-2: Construction de quelques types de bioréacteur à lit fixe 47
Figure VI-3: Construction de quelques types de bioréacteur à lit fluidisé 48
Figure VI-4*:* Schéma des deux types de bioréacteurs à membrane : (a) à boucle externe et (b) à membrane immergée 49

Partie B : Etude expérimentale

Figure VIII-1: Protocole d'extraction de la peroxydase à partir du navet. 58
Figure VIII-2 : Protocole de purification de la peroxydase du navet par précipitation à l'acétone. 59
Figure VIII-3 : Réaction entre le phénol et la peroxydase de d'hydrogène en présence de 4-amino-antipyrine et la peroxydase 59
Figure VIII-4 : Activité enzymatique pour les deux extraits: EBB, EEPP. 60
Figure VIII-5 : Aspect des deux extraits : A) Extrait brut, B) Extrait enzymatique partiellement purifié par précipitation à l'acétone..... 63
Figure IX-1 : Protocole d'immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de calcium. 64
Figure X-1: Photo du bioréacteur à lit fixe. Ø=3.5 cm 66
Figure X-2 : Photo du bioréacteur mécaniquement agité 67
Figure XI-1: 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). 70
Figure XI-2 : Variation du rendement du NET en fonction du débit pour cinq fraction de 10mL dans le bioréacteur mécaniquement agité ([NET]= 50mg/L)..... 71
Figure XI-3: Effet de débit sur le rendement de décoloration du NET dans les deux bioréacteurs ([NET]=50mg/L). 72
Figure XI-4: 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=200 ml/h).. 73
Figure XI-5: Variation de rendement de décoloration en fonction de la concentration du NET pour cinq fractions de 10 ml dans le bioréacteur mécaniquement agité (D=200mL/h). 73
Figure XI-6 : Effet de la concentration du colorant sur le rendement de décoloration du NET dans les deux bioréacteurs à lit fixe et mécaniquement agité (D= 200 ml/h). 74
Figure XI-7 : Variation du rendement de décoloration en fonction de temps dans le bioréacteur à lit fixe (D=200mL/h, [NET]=50mg/L). 75

Figure XI-8: Variation du rendement de décoloration en fonction de temps dans le bioréacteur agité (D=200mL/h, [NET]=50mg/L). 76
Figure XI-9 : Stabilité du conduite des deux bioréacteurs (D= 200 ml/h, [NET]=50mg/L). .. 76
Figure XI-10: variation du taux de conversion (X) calculé dans le bioréacteur parfaitement agité en fonction de la concentration initiale de substrat (s_0) pour différentes valeurs de débit (D)…….78
Figure XI-11 : Variation de rendement théorique et pratique en fonction de débit dans le bioréacteur parfaitement agité, à concontation S_0 = 50mg/L 79
Figure XI-12 : Variation de rendement théorique et pratique en fonction de la concentration du substrat 80
Figure 0-13: variation du taux de conversion (X) en fonction de la concentration initiale de substrat (s_0) pour différentes valeurs de débit (D)……80
Figure 0-14 Variation de rendement théorique et pratique de conversion du NET en fonction de débit dans le bioréacteur à lit fixe, à la concentration So= 50 mg/L……..81
Figure IX.15 Comparaison entre rendement pratique et théorique en fonction de So pour la conversion du NET dans le bioréacteur à lit fixe (F= 200mL/h)…….81

Annexe

Figure A-1: Mise en évidence de l'activité peroxydasique par le test (eau oxygénée, phénol, 4-aminoantipyrine).
Figure A-2: Mise en évidence de l'activité catalytique de la peroxydase dans le navet.
Figure A-3: Courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène.
Figure A-4: Courbe d'étalonnage de la protéine SAB suivant la méthode de Bradford.
Figure A-5 : Courbe d'étalonnage du colorant NET.
Figure A-6 : Activité enzymatique pour enzymatique de peroxydase libre (dans alginate) et dans $CaCl_2$

Liste des tableaux

Partie A : Synthèse bibliographique

Tableau I-1: Principaux groupes chromophores et auxochromes, classés par intensité Croissante 6
Tableau II-1: Norme algérienne (n° 06-141) des rejets d'effluents d'industrie textile 16
Tableau II-2 : Comparaison de technologies physiques, chimiques et biologique, de dépollution des effluents textiles chargés de colorants synthétiques..... 25
Tableau III-1 : Classification des enzymes selon la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie 29
Tableau IV-1 : Classification des supports d'immobilisation 40

Partie B : Etude expérimentale

Tableau VII-1: Propriétés du noir ériochrome T 54
Tableau VII-2 : Propriétés des réactifs de dosage de l'activité enzymatique 55
Tableau VII-3 : Equipements et verrerie utilisés 56
Tableau VIII-1 : Caractérisation des deux extraits avant et après la purification..... 62
Tableau IX-1: Caractéristiques des billes d'alginate de calcium contenant la peroxydase. 65

Liste des abréviations

Abréviations

Abréviation	Signification
CI	Color Index
DBO	Demande biologique en oxygène
DCO	Demande chimique en oxygène
DO	Densité Optique
E	Enzyme
EEB	Extrait Enzymatique Brut
EEPP	Extrait Enzymatique Partiellement Purifié
HRP	Horseradish peroxidase
IUB	International Union of biochemistry
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LiP	Lignine peroxidase
MATE	Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement
MnP	Manganèse peroxidase
NET	Noir Eriochrome T
P	Produit
S	Substrat
SAB	Sérum d'Albumine Bovine

Nomenclature et symbole

Symbole	Signification	Unité
$[S]_0$	Concentration initiale du substrat	mg/l
AE	Activité enzymatique	UI/mL
d	Diamètre moyen des billes	cm
D	Débit d'alimentation	mL/h
ε	Coefficient d'extinction molaire	$mol^{-1} \cdot l \cdot cm^{-1}$
K_M	Constante de Michaelis-Menten	mg/L
	Facteur d'efficacité du biocatalyseur	
R	Rendement de décoloration	%
R^2	Coefficient de corrélation	
t	Temps	min
T	Température	C°
V_{max}	Vitesse maximale de réaction	mg/L.min
λ_{max}	Longueur d'onde maximale	nm
P	Masse volumique moyenne des billes	mg/mL

Introduction générale

Depuis 1856, lorsque le premier colorant synthétique a été signalé, l'utilisation des colorants dans les industries a augmenté de façon remarquable. Les colorants constituent l'une des plus grandes classes de composés organiques à risque pour l'environnement. Plus de 700.000 tonnes sont produites annuellement et plus de 100.000 différents types de colorants sont actuellement disponibles sur le marché mondial **[1**].

Les colorants azoïques, très largement utilisés dans la teinture des textiles, constituent la moitié de cette quantité **[2].** Environ 15 à 20 % de la production mondiale se perd durant le processus de teinture des textiles et sera entraînée dans les effluents **[3].** Ces derniers seront caractérisés par de fortes colorations, des pH loin de la neutralité, de fortes demandes chimiques en oxygène (DCO) et une biotoxicité accrue à l'égard des bactéries **[4].** Leur évacuation directe dans l'environnement constitue une source importante de pollution, pouvant conduire à l'eutrophisation, la perturbation de la vie aquatique et l'accumulation de substances toxiques résultant de la transformation chimique ou biochimique des colorants.

Compte tenu de cette situation, un nouveau procédé de destruction de polluants a été développé ces deux dernières décennies. Le principe de cette technique alternative, réside essentiellement dans l'utilisation des enzymes oxydoréductases tel que la peroxydase. Cette technique qui est plus prometteuse, sera donc appelée à jouer un rôle important dans le processus de décontamination des ressources en eaux, en fournissant un moyen très efficace de décolorer, voire de dégrader totalement ces polluants organiques.

L'utilisation des enzymes est connue depuis longtemps. A l'origine, Parmi les milliers d'enzymes indentées et souvent connus dans les moindres détails, on s'est intéressé à l'une des plus répandues, la peroxydase (EC : 1.1.1.1.7) qui catalyse la dégradation des colorants. Ce type d'enzyme existe chez les animaux, les végétaux (la source la plus commune est la racine de radis ou de raifort (radis noir), le navet...), les champignons et les bactéries aérobies. La fonction principale de la peroxydase est la décomposition des peroxydes, tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), pour oxyder des composés organiques, ce qui lui vaut son nom.

Des techniques modernes telles que l'utilisation de milieux réactionnels non conventionnels (solvants organiques, micro-ondes, ions métallique, micelles…). La création de super protéines enzymatique modifiées chimiquement ou par génie génétique et l'optimisation de la structure/ fonction par les techniques de l'ingénierie protéique, ont permis d'obtenir des enzymes spécifique et très performantes.

L'emploi des enzymes a été développé après la mise ou point de méthodes d'extraction, de séparation et de purification sans altérer leur fonctionnement. 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 **[5].**

A l'échelle industrielle, il est nécessaire de concevoir un bioréacteur à haute performance, stable et économique. Le choix du type de bioréacteur, son dimensionnement et son mode de conduite reposent sur la connaissance des cinétiques des réactions biochimiques et de leur couplage avec les vitesses de transfert de substrat. Pour le traitement des eaux et des effluents, les réacteurs à lit fixe, suivis des réacteurs agités, sont les plus utilisés **[6].** Le mode de fonctionnement continu est le plus adéquat du point de vue productivité et cout économique en comparaison avec le mode discontinu (batch).

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 en continu d'un colorant azoïque le "Noir Eriochrome T" (NET), dans un bioréacteur à lit fixe, et un autre, mécaniquement agité, contenant la peroxydase immobilisée comme biocatalyseur. Dans ce contexte, notre étude est divisée en deux parties essentielles :

La première partie A : Une synthèse bibliographique qui rassemble :

- Les données essentielles sur les colorants azoïques, puis un aperçu la Pollution industrielle par les colorants azoïques et leur impact environnemental.
- Les différentes méthodes de traitement des effluents colorés (principe, avantages et inconvénients) sont illustrées. Un regard particulier sera concentré sur la dégradation des colorants par voie enzymatique.
- les différentes caractéristiques des enzymes notamment la peroxydase,
- Une partie aura pour objectif la présentation des différentes configurations de bioréacteurs, leurs caractéristiques. Un aperçu sera donné sur le calcul des réacteurs enzymatiques permettant le dimensionnement ou la détermination des paramètres opératoires de fonctionnement optimal.

La deuxième partie B : Une étude expérimentale qui s'intéresse essentiellement à la description générale du matériel et des méthodes utilisées au cours de l'élaboration de ce travail suivi par une discussion des résultats obtenus. On a traité dans cette partie les points suivants :

- Méthodes d'extraction, de purification et d'immobilisation de la peroxydase.
- Dégradation en continu d'un colorant modèle, le Noir Erichrome T (NET) par la peroxydase immobilisée dans l'alginate de calcium, dans deux types de bioréacteurs : le bioréacteur à lit fixe et le bioréacteur ouvert mécaniquement agité. Les effets de certains paramètres opératoires (débit d'alimentation, concentration du colorant, stabilité de fonctionnement) sur la performance des bioréacteurs seront étudiés.

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

Partie A :

Synthèse biobibliographique

I. GÉNÉRALITÉS SUR LES COLORANTS

I.1. Introduction

Les colorants sont essentiellement des molécules aromatiques qui se caractérisent par leur capacité à absorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible (380 à 700 nm). Ces molécules, peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Aujourd'hui il y a plus de 10000 colorants, ce nombre important a nécessité l'établissement d'un système de classification, un index des colorants en anglais a été mis au point par la « society of dyers and colorists » (UK) et par l' «American Association of textile chemists and colorists » noté (color Index C.I.), qui décrit les caractéristiques essentielles de chaque colorant **[7,8].**

La contamination des ressources en eau, principalement au niveau de la qualité, est un problème qui se pose avec acuité de nos jours. Elle est le résultat de l'utilisation massive de polluants organiques et minéraux d'origine agricole, urbaine et industrielle. Ainsi, les colorants synthétiques employés dans l'industrie textile, représentent ce type de contaminants. Dans ces conditions, la contamination est essentiellement due à leurs rejets dans les rivières. Afin de préserver et d'améliorer la qualité de ces eaux, des techniques de traitements classiques ont été déjà mises en œuvre par le passé. Elles font intervenir plusieurs procédés biologique tels que : méthode microbiologique et enzymatique.

I.2. 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. Ces colorants sont tous des composés aromatiques qui proviennent essentiellement des plantes, telles que l'alizarine et l'indigo **[7].**

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 $20^{ème}$ siècle, les colorants synthétiques ont presque complètement supplantés les colorants naturels **[9].**

I.3. Définition du colorant

Un colorant est une matière colorée par elle-même, capable de se fixer sur un support. La coloration plus ou moins intense des différentes substances est liée à leur constitution chimique **[10].** Les matières colorantes se caractérisent par leur capacité à absorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible (380 à 750 nm). La transformation de la lumière blanche en lumière colorée par réflexion sur un corps, par transmission ou diffusion, résulte de l'absorption sélective d'énergie par certains groupes d'atomes appelés chromophore. La molécule colorante étant le chromogène (l'arrangement complet d'atomes qui donne naissance à la couleur observée). Plus la facilité du groupe chromophore à donner un électron est grande et plus la couleur sera intense (groupes chromophores classés dans le **Tableau I.1).**

D'autres groupes d'atomes du chromogène peuvent intensifier ou changer la couleur due au chromophore : ce sont les groupes auxochromes. Les chromophores sont des groupes aromatiques (système π), conjugués (liaison π), comportant des liaisons non-liantes (électron n) ou des complexes de métaux de transition. Les colorants diffèrent les uns des autres par des combinaisons d'orbitales moléculaires. La coloration correspond aux transitions possibles après absorption du rayonnement lumineux entre ces niveaux d'énergie propres à chaque molécule **[11].**

De manière générale, les colorants consistent en un assemblage de groupes chromophores, auxochromes et de structures aromatiques conjuguées (cycles benzéniques, anthracène, perylène, etc.). Lorsque le nombre de noyau aromatique augmente, la conjugaison des doubles liaisons s'accroît et le système conjugué s'élargit. L'énergie des liaisons π diminue tandis que l'activité des électrons π ou n augmente et produit un déplacement vers les grandes longueurs d'onde. De même lorsqu'un groupe auxochrome donneur d'électrons (amino, hydroxy, alkoxy…) est placé sur un système aromatique conjugué, ce groupe se joint à la conjugaison du système π, la molécule absorbe dans les grandes longueurs d'onde et donne des couleurs plus foncées **[12].**

Tableau I-1: Principaux groupes chromophores et auxochromes, classés par intensité Croissante **[14,13].**

Groupes chromophores	Groupes auxochromes
Azo (-N=N-)	Amine primaire ($-NH_2$)
Nitroso (-N=O)	Amine secondaire (-NHR)
Carbonyl (=C=O)	Amine tertiaire ($-NR_2$)
Vinyl (-CH=CH-)	Hydroxyl (-OH)
Nitro ($-NO_2$)	Alkoxyl (-OR)
Sulphure (>C=S)	Donneurs d'électrons (-Cl)

I.4. Utilisation des colorants

L'industrie des colorants constitue un marché économique considérable car de nombreux produits industriels peuvent être colorés, principalement :

- Colorants textiles à usage vestimentaire, de décoration, du bâtiment, du transport, colorants textiles à usage médical etc.
- Carburants et huiles (industrie automobile etc.,...)
- Colorants et conservateurs (industrie pharmaceutique)
- Colorants capillaires (industrie des cosmétiques)
- Pigments des peintures, matériaux de construction, céramiques (industrie du bâtiment)
- Encre, papier (imprimerie)
- Colorants alimentaires (industrie agro-alimentaire)

I.5. Classification des colorants

Les colorants synthétiques sont classés selon leur structure chimique et leur méthode d'application sur différents substrats (textiles, papier, cuir, matières plastiques, etc.).

I.5.1. Classification technologique ou (appellation usuelle)

La classification technologique permet à l'utilisateur de connaître le mode d'application du colorant, et donc ses domaines d'utilisation, ses propriétés (solubilité, affinité pour tel type de fibres ou matériaux, nature de la fixation …). Il est souvent difficile de connaître la composition chimique des colorants car la confidentialité sur la composition chimique est généralement préservée. Cette classification comprend trois éléments :

- Le nom générique de la classe d'application ;
- La couleur ;

- Le numéro d'ordre chronologique d'inscription au "colour index "

I.5.2. Classification technique

Les colorants utilisés dans l'industrie textile contiennent habituellement des groupes acides sulfoniques qui leur confèrent une hydro-solubilité appropriée et qui permettent à la molécule du colorant de se lier ioniquement aux sites chargés du réseau polymérique du tissu **[14].** On peut classer les colorants organiques en deux catégories suivant leur synthèse :

- Colorants naturels
- Colorants synthétiques

I.5.2.1. Les colorants naturels

Ils sont très répandus, surtout dans les plantes (bois, racines, graines, fleurs et fruits) et même dans les micro-organismes et le corps des animaux. On les trouve à l'état libre ou liés à des glucides ou des protéines, exemple : garance, cochenille, indigo, pourpre.

Aujourd'hui, l'importance économique des colorants organiques naturels a beaucoup diminué. Du fait de leur cherté, on ne les utilise dans l'industrie textile, du cuir et du papier que pour des traitements spéciaux. Ils restent, en revanche très utilisés dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques soumis à des réglementaires plus strictes **[15].**

I.5.2.2. Les colorants synthétiques

Les colorants synthétiques dominent aujourd'hui le marché surtout que leurs propriétés peuvent être précisément adaptées à leur utilisation. Tous ces colorants sont synthétisés principalement à partir des produits pétroliers, notamment du benzène et de ses dérivés (toluène, naphtalène, xylène et anthracène) **[16].** Ils sont de plus en plus utilisés dans les industries de coloration et des textiles grâce à leur synthèse assez facile, à leur production rapide et à la variété de leurs couleurs comparées aux colorants naturels **[17].**

La dénomination des colorants commerciaux est loin de présenter la rigueur de celle des composés chimiques parce que, d'une part ce ne sont généralement pas des produits purs et que, d'autre part, les fabricants préfèrent très souvent ne pas en divulguer la composition exacte. Cela a conduit, sous une inspiration poétique, à baptiser les premiers colorants de noms de plantes (mauvéine, fushine, garance, etc.) puis de noms de minerais (vert malachite, auramine, etc.). Par la suite, ils furent désignés selon la constitution chimique du composé de base (bleu de méthylène, noir d'aniline, vert naphtalène, etc.).

Actuellement, les fabricants de matières colorantes déposent des marques protégées qui ne donnent aucune indication sur la structure, mais caractérisent la nuance et les procédés d'application. Ainsi, chaque colorant est désigné par sa couleur, sa marque commerciale et un code qui permet d'insister sur une nuance (par exemple : R = red ; Y = Yalow ou G= green; B = bleu ; 2B = more bleu, etc.) ou une qualité (L =résistant à la lumière). La production totale mondiale de colorants est estimée à 800millions tonnes/an **[18].**

I.5.3. Classification chimique

Le classement des colorants selon leur structure chimique repose sur la nature du groupement chromophore **(Tableau I-1),** Les colorants azoïques faisant l'objet de cette étude seront traités plus en détail ultérieurement. Les colorants sont répartis en différentes familles tels que :

I.5.3.1. Les colorants anthraquinoniques

Les colorants anthraquinoniques sont d'un point de vue commercial, les plus importants, après les colorants azoïques. Leur formule générale dérivée de l'anthracéne montre que le chromophore est un noyau quinonique sur lequel peuvent s'attacher des groupes hydroxyles ou amino. Ces produits sont utilisés pour la coloration des fibres polyester, acétate et tri acétate de cellulose. Ils constituent en effet la classe de colorants présentant la plupart du temps les meilleures stabilités à la lumière et aux agents chimiques. La molécule de base de ce groupe de colorants est l'anthraquinone qui présente le groupe chromophore carbonyle (**>C═O**) sur un noyau quinonique, qui est le chromogène **[19].**

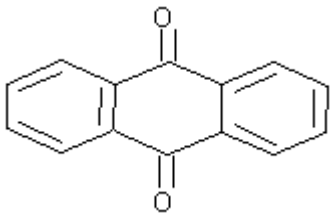


Figure I-1 : Structure chimique de la molécule anthraquinone (9,10-dihydro-9,10-dioxoanthracéne, dérivé de l'anthtracéne) **[19].**

I.5.3.2. Les colorants du diphénylamine et du triphénylméthane

Les colorants triphénylméthanes dérivent du triphénylméthane, qui est un hydrocarbure possédant trois cycles phényle liés a un carbone central. On retrouve cette structure de base dans un grand nombre de composés organiques colorés. Les colorants triphénylméthanes et leurs dérivés hétérocycliques constituent la plus ancienne

classe de colorants synthétiques. Actuellement bien moins importants que les colorants azoïques et anthraquinoniques, ils ont conservé une certaine valeur commerciale, car ils permettent de couvrir la totalité de la gamme de nuances. Les triphénylméthanes sont utilisés intensivement dans les industries papetières et textiles pour teindre le nylon, la laine, la soie et le coton. Leur utilisation ne se limite pas à l'industrie. On les retrouve également dans le domaine médical comme marqueurs biologiques et comme agents antifongiques chez les poissons et la volaille. Un exemple d'un tel colorant est le jaune 2 :

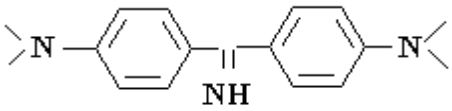


Figure I-2 : Structure chimique du Jaune 2 (colorant diphénylamine) [19].

I.5.3.3. Les colorants polyethniques

Un exemple important de colorant polyméthinique pour lequel le groupe chromophore est (**-CH=)** ou (**-CR=)** est le jaune 11 dont la formule est la suivante :

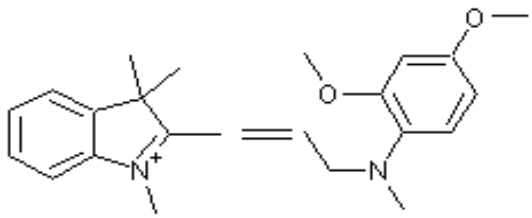


Figure I-3 : Structure chimique du Jaune 11 colorants (polyméthiniques) **[19].**

I.5.3.4. Les colorants Phtalocyanines

Ont une structure complexe basée sur l'atome central de cuivre. Les colorants de ce groupe sont obtenus par réaction du dicyanobenzéne en présence d'un halogénure métallique (Cu, Ni, Co, Pt, etc.). Parmi les phtalocyanines, le colorant le plus utilisé est la phtalocyanine de cuivre, qui est le plus stable. Les applications les plus importantes concernent le domaine des pigments **[19].**



Figure I-4: Structure de phtalocyanine. Exemple : phtalocyanine de cuivre **[19].**

I.5.3.5. Colorants indigoïdes

Les colorants indigoïdes tirent leur appellation de l'indigo dont ils dérivent. Ainsi, les homologues séléniés, soufrés et oxygénés du bleu indigo provoquent d'importants effets hypsochromes avec des coloris pouvant aller de l'orange au turquoise. 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 **[20].** Le plus important des colorants indigoïdes est l'indigo lui-même, qui a la structure suivante :

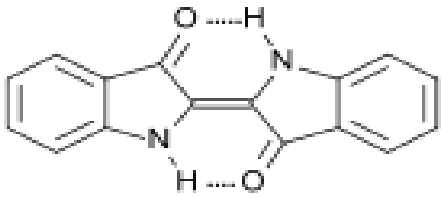


Figure I-5 : Structure chimique de l'indigo **[20].**

I.5.3.6. Les colorants xanthines

Ce sont des composés qui constituent les dérivés de la fluorescéine. Ils sont dotés d'une intense fluorescence. Peu utilisés en tant que teinture, leur faculté de marqueurs lors d'accidents maritimes ou de traceurs d'écoulement pour des rivières souterraines est malgré tout bien établie. Ils sont aussi utilisés comme colorants alimentaires, cosmétiques, textiles et impression **[21,22].**

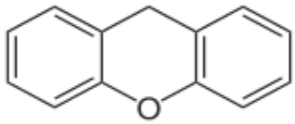


Figure I-6 : Structure moléculaire d'une colorante xanthine **[21,22].**

I.5.3.7. Les colorants nitrés et nitrosés

Ils forment une classe de 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) **[21,22].**

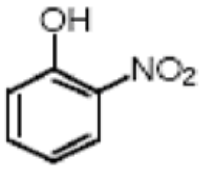


Figure I-7 : Structure moléculaire d'un colorant nitré et nitrosé **[21,22].**

I.5.4. Classification tinctoriale

Si la classification chimique présente un intérêt pour le fabricant de matières colorantes, le teinturier préfère le classement par domaines d'application.

I.5.4.1. Colorants réactifs

Les colorants réactifs constituent la dernière classe de colorant apparue sur le marché. Leur utilisation est très importante, notamment dans le domaine de l'habillement (la solidité à la lumière n'est suffisante que pour des applications en ameublement). Ce sont des colorants de synthèse constitués d'une partie colorante chromogène (groupe chromophore) sur laquelle est (sont) fixé(s) un (ou plusieurs) groupement (s) réactifs(s) électrophile(s) destiné(s) à former une liaison chimique stable, covalente, solide avec les fonctions hydroxyles de la cellulose et les NH_2 et NH des polyamides, voire plus rarement avec les fonctions amines ou sulfures des protéines de la laine **[23].** La réaction entre le colorant et la cellulose est obtenue par l'action d'un agent alcalin (soude caustique, carbonate de sodium,…etc.) qui absorbe l'atome ou le groupement réactif électronégatif du colorant pendant que l'ion coloré se lie à la cellulose **[24].** Ces colorants ont les structures suivantes :

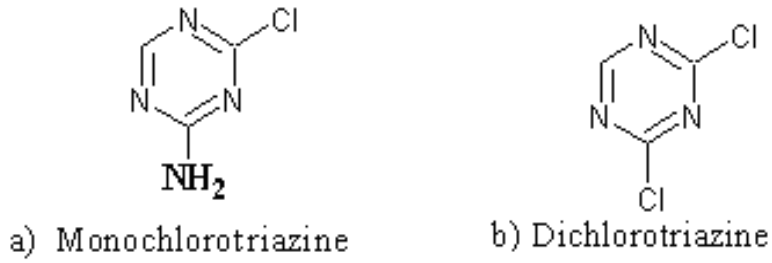


Figure I-8 : Structure de base des colorants réactifs **[24]**.

I.5.4.2. Colorants directs

Ce sont des colorants à caractères anioniques (R-SO_3Na) ; ils sont solubles dans l'eau et utilisés en solution aqueuse. La solubilité de ces colorants dans l'eau est réduite par l'addition des sels neutres de métaux alcalins (sulfate de sodium, chlorure de sodium, etc. Ceux d'entre eux qui sont les moins stables à la lumière sont utilisés à la teinture des tissus de doublures, des fils de laine, des tapis et pour beaucoup d'articles à bon marché **[24].**

I.5.4.3. Colorants dispersés

Les colorants dispersés (ou dispersifs) donnent des couleurs stables à la lumière, aux acides, au formaldéhyde et aux actions thermiques. Ils sont non-ioniques, insolubles dans l'eau et sont utilisés pour la coloration sous forme de dispersion aqueuse. Pratiquement insolubles dans l'eau, ils sont par contre solubles dans la phase organique des fibres dépourvues de groupement acides ou basiques (fibres synthétiques telles que polyester, polyamide, polyacrylonitrile...)

Les colorants dispersés sont essentiellement adsorbés sur la fibre polyamide par une attraction sur des sites polaires en nombre limité et le mécanisme de dissolution est en réalité presque marginal. Bien que ce type d'adsorption corresponde à des liaisons avec la fibre bien plus fortes que dans le cas du polyester où le colorant est dissout, ces liaisons sont facilement rompues par un rupteur de liaisons polaire tel que l'eau. Les solidités au lavage de fibres de polyamide teintes en colorant dispersé sont donc médiocres. Ainsi, on doit connaître la solubilité du colorant dans le bain de teinture, son affinité pour les diverses fibres et 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. On distingue différentes catégories tinctoriales définies cette fois par les auxochromes **[25].**

I.5.4.4. Les colorants acides ou anioniques

Ils sont solubles dans l'eau grâce à leurs groupements sulfonâtes ou carboxylates, ils sont ainsi dénommés parce qu'ils permettent de teindre les fibres animales (laine et soie) et quelques fibres acryliques modifiées (nylon, polyamide) en bain légèrement acide. L'affinité colorant-fibre est le résultat de liaisons ioniques entre la partie acide sulfonique du colorant et les groupements amino des fibres textiles **[26].**

I.5.4.5. Les colorants basiques ou cationiques

Les colorants basiques ou cationiques sont des sels d'amines organiques, ce qui leur confère une bonne solubilité dans l'eau. Les liaisons se font entre les sites cationiques des colorants et les sites anioniques des fibres. En phase de disparaître dans la teinture de la laine et de la soie, ces colorants ont bénéficié d'un regain d'intérêt avec l'apparition des fibres acryliques, sur lesquelles ils permettent des nuances très vives et résistantes **[26].**

I.5.4.6. Les colorants à mordants

Les colorants à mordants contiennent généralement un ligand fonctionnel capable de réagir fortement avec un sel d'aluminium, de chrome, de cobalt, de cuivre, de nickel ou de fer pour donner différents complexes colorés avec le textile **[26].**

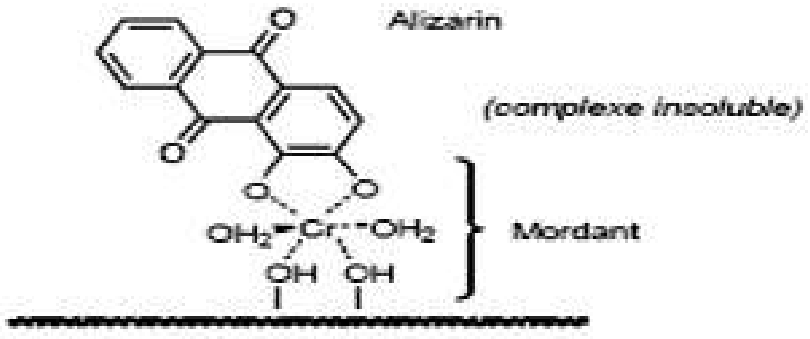


Figure I-9 : Comportement du colorant à mordant en présence du textile **[26].**

I.5.4.7. Colorants de cuve

Les colorants de cuve sont des colorants insolubles dans l'eau. Cependant, sous l'action d'un réducteur, le dithionite de sodium ($Na_2S_2O_8$)**,** un colorant de cuve donne

son leuco-dérivé c'est-à-dire le produit de réduction incolore ou blanc et soluble dans l'eau. Le leuco-dérivé présente une affinité pour certaines fibres textiles telles que le coton, le lin, la laine et la soie. Par oxydation à l'air ou à l'aide d'un agent oxydant, le colorant initial insoluble dans l'eau est régénéré au sein de la fibre.

Les colorants de cuve appartiennent à la classe chimique des anthraquinones et à celle des indigoïdes, leurs qualités de résistance notamment en font un des groupes les plus importants des colorants synthétiques **[13].** Quelques colorants de cuve ont trouvé une place parmi les pigments de l'industrie des vernis, en raison de leur grande stabilité à la lumière **[27].**

II. LES COLORANTS AZOÏQUES

II.1. Historique

C'est en 1863 que Mitscherlich découvre l'azobenzène C_6H_5-N=N-C_6H_5, mais c'est Peter Griess qui effectue les premiers travaux systématiques à partir de 1858 en donnant la méthode de préparation très générale de ces produits. Le groupement chromophore (-**N═N**-) a été découvert par P. Griess en 1858 **[27].** Suivant le nombre de chromophores « ***azo*** **»** rencontrés dans la molécule, on distingue les monoazoïques, les diazoïques et les polyazoïques. Les colorants azoïques sont caractérisés par la présence au sein de la molécule d'un groupement azoïque (-**N═N**-) reliant deux noyaux benzéniques. Cette catégorie de colorants est actuellement la plus répondue sur le plan de l'application, puisqu'ils représentent plus de 50% de la production mondiale de matières colorantes**.** Les colorants azoïques se répartissent en plusieurs catégories ; les colorants basiques, acides, directs et réactifs solubles dans l'eau, et les azoïques dispersés et à mordant non-ioniques insolubles dans l'eau **[28,29].**

II.2. 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 (Figure .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–) **[30].**

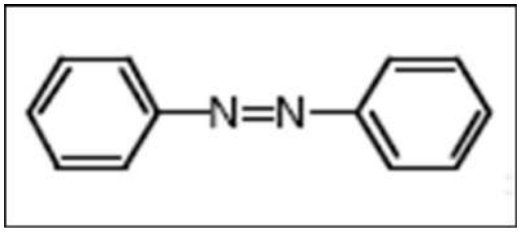


Figure II-1: Structure chimique générale des colorants azoïques **[31].**

II.3. Principales familles des colorants azoïques

Les composés azoïques sont répartis en plusieurs familles selon le nombre de liaisons azo que l'on trouve dans leurs molécules:

- ❖ Mono-azoïques: une seule liaison azo
- ❖ dis-azoïques: deux liaisons (à ne pas confondre avec les diazoïques)
- ❖ Poly-azoïques: trois et plus.

II.4. Pollution industrielle par les colorants azoïques

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme le sous-produit de l'action humaine, au travers d'effets directs ou indirects altérant les modalités de répartitions des flux d'énergie, des niveaux de radiations, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes. Ces modifications peuvent affecter l'homme directement ou au travers des ressources en produits agricoles, en eau, et autres produits biologiques. Elles peuvent aussi l'affecter en altérant les objets physiques qu'il détient, les possibilités récréatives du milieu ou encore en enlaidissant la nature **[32].** La pollution de l'eau est due essentiellement aux activités humaines ainsi qu'aux phénomènes naturels. Elles a des effets multiples qui touchent aussi bien la santé publique que les organismes aquatiques. Selon le type de polluant, on peut classer la pollution en trois catégories **[32]:**

- ❖ **Pollution physique :** on parle de ce type de pollution quand le milieu pollué est modifié dans sa structure physique par divers facteurs. Elle regroupe la pollution mécaniques, la pollution thermique et la pollution atomique.
- ❖ **Pollution chimique :** elle est due au déversement des rejets industriels apportant de grandes quantités de substances chimiques dont certaines sont non dégradables.
- ❖ **Pollution biologique :** il s'agit de la pollution par les micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons, etc.).

Les rejets industriels véhiculent une importante pollution organique et toxique. Il s'agit de différents déchets provenant des industries diverses qui sont principalement installées au niveau du rivage à la fois pour se débarrasser des déchets directement et pour faire refroidir les machines (industrie alimentaire, industrie chimiques, tannerie et textile). L'impact des rejets industriels sur la qualité de l'eau est fonction de leur affinité avec l'oxygène, de la quantité de solides en suspension, et de leurs teneurs en substances organiques et inorganiques. En définitif, la pollution des eaux par les matières organiques est un problème mondial dont les aspects et la portée sont évidemment selon le niveau de développement des pays. Il importe que les concentrations des produits polluants soient les plus fiables possibles. La prévention est donc essentielle et repose sur les 3 aspects suivant **[32**]:

- L'aspect réglementaire qui consiste à fixer des normes.
- L'aspect sanitaire comporte en particulier le contrôle technique des installations.
- L'aspect scientifique et technologique enfin correspond à l'amélioration des procédés de dépollution.

Les effluents des industries textiles font partis des eaux usées les plus mal traitées et sont caractérisés par de fortes colorations, de fortes variations de pH, de fortes demandes chimiques en oxygène (DCO) **[32].**

En Algérie, les statistiques du Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement (MATE, 1999), comptent 4 entreprises correspondant aux secteurs de la teinture et de finissage et 39 entreprises faisant partie de l'ensemble du secteur textile, avec une consommation moyenne de 40,12 ts de pigments et de colorants par ans. Sur le plan aspect environnementaux, il existe 11 stations d'épuration des eaux résiduaires, 8 usines de traitement des huiles usées, une installation de recyclage des récipients, 10 vaporisateurs de déchets textiles, 5 installations de valorisation des récipients non-pollués et 2 usines de valorisation des plastiques.

D'après les données fournies par le MATE, 70% des industries correspondant aux sous secteurs textiles de la teinture, du finissage et de l'impression réalisent le rejet sans épuration préalable. L'Algérie est dotée d'un décret exécutif n° 06-141 (23 avril 2006) définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides de l'industrie de textile (**Tableau. II.1**) **[33].**

Tableau II-1: Norme algérienne (n° 06-141) des rejets d'effluents d'industrie textile **[33].**

PARAMÈTRES	UNITÉ	VALEURS LIMITES	TOLÉRANCE AUX VALEURS LIMITES ANCIENNES INSTALLATIONS

Température	°C	30	35
Ph	-	6.5-8.5	6-9
DBO_5	mg/L	150	200
DCO	-	250	300
Matière décantable	-	0.4	0.5
Matière non dissoute	-	30	40
Oxydabilité	-	100	120
Permanganate	-	20	25

II.5. Impacts environnementaux des colorants azoïques

Les rejets d'effluents des industries textiles, chargés en colorants, dans l'écosystème est une source dramatique de pollution et de perturbation non esthétique dans la vie aquatique qui peut nuire considérablement aux espèces animales, végétales ainsi qu'aux divers microorganismes vivant dans ces eaux. La majorité des colorants sont caractérisé par une très faible biodégradabilité, due à leurs poids moléculaire élevé et à leurs structures complexes, ce qui confère à ces composés un caractère toxique pouvant être élevé ou faible. De ce fait, ils peuvent persister longtemps dans le milieu naturel, engendrant ainsi des perturbations importantes dans les différents mécanismes naturels existant dans la flore et provoquant l'inhibition de la croissance des végétaux aquatiques…) et dans la faune par la destruction d'une catégorie de poissons, de microorganismes **[34].**

Comme les colorants azoïques représentent la plus grande classe des colorants du Color Index (60 – 70%) [14], ils peuvent être considérés parmi les colorants les plus polluants, de ce fait leur effet toxique (mortalité, effet mutagenèse et cancérogenèse) a été étudiée par plusieurs travaux de recherche **[35].** La plupart des colorants azoïques ne sont pas initialement toxiques, excepté ceux à groupement amine libre. Cependant, la réduction de ces colorants (rupture de la liaison azoïque) génère la formation des amines aromatiques qui ont un risque mutagenèse et cancérigènes. A titre d'exemple. On peut citer : 1,4-phenylenediamine, 1-amino 2-naphtol, benzidine et benzidine substitués comme o-toluidine **(Figure. II.2) [35].**

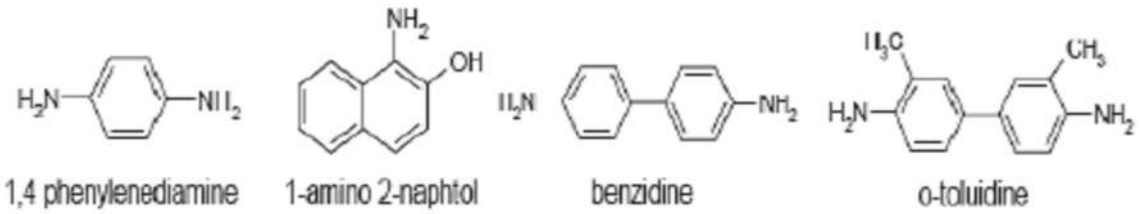


Figure II-2 : Structures chimiques de quelques amines aromatiques toxiques **[35].**

En revanche, la toxicité des amines aromatiques est fortement liée à la structure spatiale de la molécule ou, en d'autres termes, à la position des groupes aminés. Par exemple, le 2-naphtylamine est cancérigène, par contre le 1-naphtylamine est beaucoup moins toxique que le premier. La toxicité des colorants azoïques dépend ainsi de la nature et de la position des substituant. Elle est accrue par la présence de substituant sur le noyau aromatique notamment des groupes nitro (-NO_2) et halogènes (particulièrement Cl) **[33].** Selon l'EPA **[28],** l'estimation des risques de cancer impose de fixer une concentration limite de 3,1 µg/L en colorant azoïque dans l'eau potable.

II.5.1. 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 **[36].**
- **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 **[36].**
- **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. 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 **[36].**

II.5.2. 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 **[36].**
- **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 **(Figure II.3) [36].**

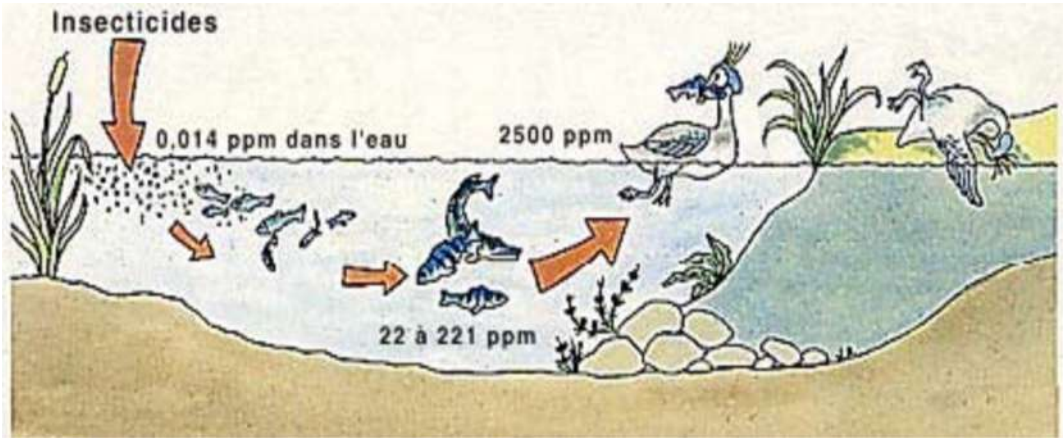


Figure II-3 : Conséquences de la bioaccumulation après déversement d'un colorant azoïque dans un cours d'eau **[36].**

II.6. Méthodes de traitement des effluents colorés

Au cours des différentes étapes de teintures, des quantités plus ou moins importantes de colorants sont perdues par manque d'affinité avec les surfaces à teindre ou à colorer **(tableau .II.1).** Ces rejets organiques sont toxiques et nécessitent une technique de dépollution adaptée. Le traitement des rejets textiles, compte tenu de leur hétérogénéité de composition, conduira toujours à la conception d'une chaîne de traitement assurant l'élimination des différents polluants par étapes successives. La première étape consiste à éliminer la pollution insoluble par l'intermédiaire de prétraitements (dégrillage, dessablage, déshuilage..) et/ou de traitements physiques ou physico-chimiques assurant une séparation solide - liquide. Les techniques de dépollution intervenant le plus couramment en deuxième étape dans les industries textiles d'après **[37]** se divisent en trois types: (physique, chimique et biologique).

II.6.1. Méthodes physiques de traitement

II.6.1.1. Filtration sur membrane

La filtration sur membrane pilotée par pression hydraulique se décline en Micro filtration, ultrafiltration, nanofiltration et osmose inverse. L'effluent passe à travers une membrane semi- perméable qui retient en amont les contaminants de taille supérieure au diamètre des pores, pour produire un perméat purifié et un concentré qui reçoit les impuretés organiques. Parmi les quatre types de procédés, la nanofiltration et l'osmose inverse sont les

plus adaptés à la réduction partielle de la couleur et des petites molécules organiques, mais l'osmose inverse reste la plus répandue **[38]**. Ces procédés limités dans leurs applications, nécessitent des investissements importants en capitaux et le retraitement du concentré est jusqu'à six fois plus cher que celui de l'effluent originel **[38].**

II.6.1.2. Adsorption sur charbon actif (ou sur un autre adsorbant)

Lors de l'adsorption, le polluant est transféré de la phase liquide vers la phase solide. Le charbon activé est l'adsorbant le plus communément utilisé pour la réduction de la couleur, mais il reste très onéreux et nécessite en plus une régénération. C'est dans ce contexte que l'ont intéressé à la valorisation d'un rejet de l'industrie alimentaire, qui est le grignon d'olive pour l'utiliser comme adsorbant pour la décoloration des rejets de l'industrie textile. D'autres recherches ont opté pour valoriser ou utiliser d'autres matières naturelles (sciure, écorce et farine de bois…) moins onéreuses pour l'extraction des colorants par adsorption **[38].**

II.6.2. Méthodes chimiques de traitement

Dans la littérature, les techniques d'oxydation chimique sont généralement appliquées pour le traitement des composés organiques dangereux présents en faibles concentrations, en prétraitement avant des procédés biologiques, le traitement d'eaux usées chargées de constituants résistant aux méthodes de biodégradation et en post-traitement pour réduire la toxicité aquatique **[38].**

Les deux réactifs les plus souvent énumérés pour ce type de traitement sont H_2O_2 et le Chlore. Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant fort et son application pour le traitement des polluants organiques et inorganiques sont bien établis **[38].** Mais l'oxydation seule par H_2O_2 n'est pas suffisamment efficace pour de fortes concentrations en colorant. **[38]** ont proposé de traiter les colorants azoïques par l'hypochlorite de sodium mais, même si la molécule initiale est détruite, les halogènes sont susceptibles de former des trihalométhanes cancérigènes pour l'homme avec les sous-produits de dégradation.

II.6.2.1. Quelques procédés d'oxydation avancée (POA)

II.6.2.1.1. Réactif de Fenton (H_2O_2/Fe^{2+})

Fenton avait décrit à la fin du XIX^{e} siècle que le fer ferreux favorisait fortement l'oxydation de l'acide maléique par le peroxyde d'hydrogène en milieu acide (FENTON,

1894). Des travaux ultérieurs ont montré que la combinaison de H_2O_2 et de Fe^{2+}, nommée « réactif de Fenton », était un oxydant efficace pour une grande variété de substrats organiques, notamment les phénols, les pesticides, les aromatiques polycycliques et des colorants, en particulier les azoïques. Quarante ans plus tard, identifiaient le radical hydroxyle comme étant l'espèce oxydante de la réaction présentée ci-dessous et communément appelée réaction de Fenton :

$$\mathbf{Fe^{2+}+H_2O_2+H^+ \rightarrow Fe^{3+}+H_2O+HO}$$

La vitesse de décomposition de H_2O_2 par le Fe(II) augmente lorsque le pH augmente (≤ 5) car, dans cette gamme de pH, la forme prédominante $Fe(OH)^{2+}$ est beaucoup plus réactive que l'ion Fe^{2+}. Les micropolluants organiques, notamment les colorants synthétiques, sont ensuite oxydés par le radical hydroxyle selon une cascade réactionnelle complexe. Les principaux paramètres déterminant la réaction d'élimination d'un micropolluant sont bien connus : temps de contact, température, concentration en peroxyde d'hydrogène et en sulfate de fer et le pH.

Le procédé Fenton est considéré aujourd'hui comme le procédé le plus utilisé en Tunisie et dans le monde pour le traitement d'effluents industriels textiles, mais ce procédé est limité par le manque de régénération du catalyseur qui nécessite généralement un apport constant en réactifs et qui contraint de ce fait à approvisionner en continu le milieu en peroxyde d'hydrogène coûteux.

II.6.2.1.2. Ozonation (O_3)

L'ozone, oxydant puissant, se décompose rapidement en dioxygène et oxygène atomique et doit être produit impérativement « *in situ* » grâce à l'émission d'une charge électrique sous haute tension dans un courant d'air sec. L'emploi de l'ozone sur les colorants a montré que les effluents chargés réagissent différemment selon leur composition **[39]** Les rejets contenant des colorants dispersés et soufrés sont particulièrement difficiles à décolorer **[40]** alors que ceux chargés de colorants réactifs, basiques, acides et directs le sont assez rapidement. Bien que le pouvoir oxydant de l'ozone soit élevé, une minéralisation complète par ozonation est très difficile **[41]** Le principal désavantage de l'application d'un système d'ozonation aux bains de teinture, outre un investissement et des coûts opératoires élevés imputables à l'énergie électrique consommée et à la maintenance, réside dans la génération de sous-produits de dégradation récalcitrants et toxiques **[30]** De plus, l'ozonation est limitée par la

très faible solubilité de O_3 dans l'eau: environ 0,1 mM à 293 K **[42]** et son transfert de masse est un facteur limitant.

II.6.2.1.3. Peroxonation (O_3/H_2O_2)

Les radicaux hydroxyles, principaux intermédiaires oxydants de la peroxonation, sont formés par réaction entre l'ozone et le peroxyde d'hydrogène :

$$O_3+H_2O_2 \rightarrow OH+HO_2+O_2$$

Même si ce procédé est plus efficace que l'ozonation pour de nombreux substrats organiques, notamment pour les colorants, son efficacité reste limitée par la vitesse de la réaction entre O_3 et H_2O_2. Ce système est affecté par les mêmes contraintes que l'ozonation [48]. En revanche, l'ozonation et la peroxonation présentent l'avantage, par rapport aux procédés avec irradiation UV, de pouvoir fonctionner dans une eau à forte turbidité, car le système ne dépend pas de la transmission des rayonnements dans l'effluent.

II.6.2.1.4. Photolyse de peroxyde d'hydrogène (UV-H_2O_2)

Sous irradiation ultraviolette, la molécule de peroxyde d'hydrogène subit une coupure homolytique pour conduire à deux radicaux hydroxyles :

$$H_2O_2+hv \rightarrow 2OH$$

La photolyse de H_2O_2 est plus avantageuse que l'ozonation et la peroxonation et son application est moins complexe, mais son efficacité est moindre en raison du faible coefficient d'extinction de H_2O_2 dans l'UV. Dans un système à réacteur fermé, le gain en efficacité pour des eaux de forte absorption UV sera limité malgré une hausse de la concentration en peroxyde. De plus, ce réactif est extrêmement instable lorsqu'il est concentré et sa décomposition en eau et en oxygène est fortement exothermique. Par ailleurs, la production des radicaux est affectée par les conditions de milieu telles que la température, le pH, la concentration en H_2O_2 et la présence de consommateurs de radicaux **[38].**

Les colorants acides se dégradent plus facilement selon ce type de procédé mais l'efficacité diminue avec l'augmentation du nombre de liaisons azoïques. Cependant, la dégradation des colorants de type réactif jaunes ou verts nécessite un temps de contact très

important alors que pour certains autres, comme ceux de type direct, métal - complexe et disperse, la décoloration est très rapide **[38].**

II.6.2.1.5. Photocatalyse de peroxyde d'hydrogène ($TiO_2/UV/H_2O_2$)

L'efficacité de la dégradation photochimique est considérablement améliorée par l'ajout de catalyseurs semi-conducteurs homogènes ou hétérogènes. Parmi les photocatalyseurs les plus communément rencontrés, l'oxyde de titane (TiO_2) présente une stabilité photochimique et une activité photocatalytique favorable au traitement des colorants **[38]** .L'excitation des électrons à la surface du semi-conducteur par les photons UV, d'énergie supérieure à l'énergie d'activation du semi-conducteur crée des trous déficients en électrons dans les couches de valence, aboutissant à la formation du radical hydroxyle et de l'anion superoxyde.

La décoloration et la dégradation des colorants sont gouvernées par les réactions oxydantes dont l'efficacité dépend de la concentration en oxygène. Le principal inconvénient est le manque de connaissance des produits de dégradation générés, les produits finaux pouvant être plus toxiques que les colorants de départ **[38].**

II.6.3. Méthodes physico- chimiques de traitement des textiles

Coagulation – floculation

Sous le terme de coagulation-floculation, on entend tous les processus physico-chimiques par lesquels des particules colloïdales ou des solides en fine suspension sont transformés par des floculants chimiques en espèces plus visibles et séparables (les flocs). Les flocs formés sont ensuite séparés par décantation et filtration puis évacués. Les coagulants inorganiques tels que l'alun donnent les résultats les plus satisfaisants pour la décoloration des effluents textiles contenant des colorants dispersés, de cuve et au soufre, mais sont totalement inefficaces pour les colorants réactifs, azoïques, acides et basiques **[38]**. Par ailleurs, la coagulation - floculation ne peut être utilisée pour les colorants fortement solubles dans l'eau. D'importantes quantités de boue sont formées avec ce procédé : leur régénération ou réutilisation reste la seule issue mais demande des investissements supplémentaires.

II.6.4. Méthodes biologiques de traitement

II.6.4.1. Méthodes microbiologiques

Basé sur les microorganismes en milieu aérobie (présence d'oxygène) ou anaérobie (Absence d'oxygène). Ce procédé peut conduire soit à une biodégradation totale avec Formation de CO_2 et de H_2O, soit à une biodégradation incomplète, pouvant aboutir à un Composé ayant une structure différente du parent produit .Le traitement biologique est souvent caractérisé par des mesures de la DBO (demande biologique en oxygène) et de la DCO (demande chimique en oxygène) **[38].**

De nombreux chercheurs ont démontré une biodégradation partielle ou complète des colorants par des cultures bactériennes pur (*Bacillus subtilis*), ou mélangé (*Pseudomonas mendocina* et *Pseudomonas alcaligenes*), de champignons (*Phanerochaete chrysosporium*) et d'algues (*Chlorella andoscillotoria*) **[39].** Cependant, il convient de signaler que cette procédure de traitement est lente et inefficace en présence de quelques substances toxiques. Ainsi, les colorants synthétiques utilisés dans le textile se sont avérés résistants à l'attaque microbienne **[34].**

II.6.4.2. 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 **[8]** :

- ❖ 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 **[39].**
- ❖ ils sont moins coûteux que les autres procédés s'ils sont produits en grande quantité **[40].**
- ❖ 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**.**

- ❖ Les enzymes peuvent aussi agir sur certains polluants récalcitrants pour les éliminer par précipitation ou les transformer aux autres produits**.**
- ❖ Ils peuvent également modifier les propriétés d'un effluent donné pour le rendre plus acceptable ou traitement**.**
- ❖ 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 **[41].**

Beaucoup de chercheurs ont montrés que les enzymes oxydoréductases y compris la 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 **[30].** 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 **[42].**

II.6.5. Résumé comparatif des procédés et analyse critique

Bien que les méthodes physiques, chimiques et physico-chimiques soient très rapides, elles se sont avérées très coûteuses et peu efficaces compte tenu des normes exigées. En effet, plusieurs études ont montré que ces méthodes sont, d'une part, efficaces contre certaines des molécules colorantes et pas sur d'autres et, d'autre part, qu'elles chargent le milieu naturel avec des polluants organiques parfois plus toxiques que les molécules d'origines **[38].** Il est à noter aussi que ces méthodes sont très coûteuses et nécessitent un équipement bien sophistiqué **[38].** Ce constat a permis aux chercheurs et aux industriels de s'orienter vers la recherche d'autres méthodes qui soient plus efficaces et moins coûteuses : ce sont les procédés enzymatiques. Après ce bref aperçu des principes de fonctionnement des différents procédés de dépollution des rejets de colorants, le tableau 4 résume les types d'application et leurs principaux avantages et inconvénients.

Tableau II-2 : Comparaison de technologies physiques, chimiques et biologique, de dépollution des effluents textiles chargés de colorants synthétiques.

Technologie	**Exemple**	**avantages**	**Incontinents**
Coagulation floculation	-Alun : AI (oh), -Ca $(OH)_2$ -FeCI, -Poly électrolytes	-Equipement simple -Décoloration relativement rapide -Déduction significative de la DCO	-Formation de boues -Adjonction obligatoire de produits chimiques -Fonctionnement onéreux -Coagulants non réutilisables -Réduction spécifique de la couleur -Peu d'information sur la réduction de DBO et DCO
Filtration sur Membranes	-Osmose inverse -Nano filtration -Microfiltration -Ultrafiltration	-Utilisation simple et rapide -Pas d'addition de produits chimiques -Faible consommation énergétique -Réduction de la couleur -Traitement de grands volumes	-Investissement important Sélectif -Encrassement rapide des membranes par colmatage Pré et post-traitement nécessaires
Adsorption	-Carbone activé	-Réduction efficace de la couleur -Technologie simple -Faible cout d'utilisation pour centaines adsorbants	-Investissements et couts de fonctionnement élevés -Lent et limité en volume -Régénération onéreuse des absorbant (voir impossible) Sélectif -Formation de boues
Oxydation Chimique	-Ozone -Réactif de fenton -Chloration	-Traitement de gros volumes -Diminution nette de la coloration -Décoloration rapide et efficace des colorants solubles -Opération simple -Oxydant puissant -Décoloration rapide et efficace	-Investissements et couts de fonctionnement élèves -Efficacité limitée pour certains colorants -Sous-produits d'oxydation inconnus -Couts élevés -Sous-produits d'oxydation inconnus -Formation de sous produits de chloration (trihalométhanes cancérogènes)

Réduction Chimique	-Chlorure d'étain -Hydro sulfite de Sodium	-Décoloration rapide et efficace des azoïques	-Formation d'amines aromatiques toxiques -Dégradation incomplète
enzymatique	Peroxydase	-Économie d'énergie -Très haute spécificité enzymatique -Conditions douces d'utilisation (pH, T) -Biodégradables -Peu de problèmes de stockage des préparations enzymatiques -Catalyseurs actifs à faibles doses -Très haute vitesse de réaction et contrôle facile -Catalyse homogène en milieux aqueux -Synthèses stéréospécifiques,... -Catalyse hétérogène (substrats insolubles, réactions en milieu organique)	-Problèmes liés à la dénaturation des enzymes -Nécessité de cofacteurs (Ca^{2+},..) pour certaines réactions -Contrôle et ajustement du pH -Milieux réactionnels variés induisant des mécanismes enzymatiques complexes -Prix élevé de certaines applications

III. LES ENZYMES

III.1. Définition et propriétés

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 ce dans des conditions douces et particulières.

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques capables de réaliser la plupart des réactions biochimiques avec une efficacité extraordinaire. Les réactions chimiques dans les systèmes biologiques se font rarement en l'absence d'enzymes. D'autre part, une enzyme ne favorise pas seulement une réaction chimique donnée, elle empêche la présence des réactions secondaires gênantes. En tant que catalyseurs, les enzymes accélèrent les ruptures et la création des liaisons. Ils le font en produisant, avec les réactifs, un complexe enzyme-substrat (ES). La partie d'enzyme directement impliquée dans la formation de ce complexe est le site actif.

Une des caractéristiques particulières de l'enzyme est leur besoin fréquent de cofacteur. Le cofacteur n'est pas une protéine : il peut être un ion métallique (Mg^{2+}, Ca^{2+},…), ou une molécule organique complexe appelée aussi coenzyme tels que le NAD, FAD, CoA, ATP **[43].**

III.2. Nomenclature et classifications

Le grand nombre d'enzymes actuellement connues par suite du développement rapide de l'enzymologie a crée de nombreux problèmes de terminologie et de classification. Dans ce conteste, trois modes de nomenclature ont été crées**.**

a. *Dénomination ancienne* : Les enzymes ont d'abord été identifiées par des noms arbitraires qui rappelaient l'origine tissulaire par exemple la pepsine désigne l'enzyme gastrique de la digestion**.**
b. *Dénomination fonctionnelle* : Une nomenclature dans la quelle on ajoute le suffixe « Ase » soit au substrat, soit au type de réaction catalysé**.**
c. *Dénomination officielle* : en 1964, l'Union Internationale de Biochimie a établi une nomenclature par 4 chiffres séparés par des points :
    - Le premier chiffre indique la classe, c'est-à-dire l'appartenance à l'un des 6 groupes de réactions (**tableau III-1**).
    - Le second chiffre désigne la sous-classe de l'enzyme. Par exemple une hydrolase peut couper une liaison ester, peptidique.etc.
    - Le troisième chiffre précise la nature de la molécule d'accepteur ou de substrat utilisé.
    - Le dernier chiffre est le numéro d'ordre de l'enzyme dans le groupe.

Cette nomenclature est généralement donnée entre parenthèses à la suite du nom de l'enzyme fonctionnel ex. Peroxydases (E.C. 1.11.1.7) **[44].**

Tableau III-1 : Classification des enzymes selon la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie **[45].**

Classe	Type de réaction canalisée
1. oxydoréductase	Catalyse les réactions d'oxydoréduction
2. transférase	Catalyse le transfert d'un groupement chimique d'une molécule à une autre
3. Hydrolase	Catalyse la coupure de liaison par d'hydrolyse
4. Isomérase	Catalyse le clivage par élimination de liaisons C-C, C-O, C-N. Une double liaison est formée dans ces réactions
5. Ligase	Catalyse la formation des liaisons avec clivage de l'ATP

III.3. Cinétique enzymatique à un seul substrat

Le pouvoir catalytique des enzymes, a la propriété d'augmenter la vitesse de la réaction, jusqu'à cent milliards (1011) de fois de la réaction spontanée. Le facteur d'accélération varie d'une enzyme à l'autre et constitue à la fois une caractéristique et une mesure de l'affinité de celle-ci **[43].** Les expériences de cinétiques enzymatiques donnent des relations entre la vitesse de réaction (v) c'est-à-dire la quantité de substrat (S) disparu ou la quantité de produit (P) formé par unité de temps **[46].**

$$: \ v = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t}$$

III.3.1. Cinétique de Michaelis-Menten

La base de leur théorie (fondée sur l'hypothèse d'équilibre), est l'idée fondamentale que l'enzyme (E) et son substrat (S) s'associent pour former un complexe enzyme-substrat réversible ES **[47]:**

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$$

Si nous mesurons la vitesse initiale de la réaction immédiatement après avoir mélangé

(E) et (S), la vitesse de la réaction inverse est négligeable puisque cette vitesse est proportionnelle à la concentration de (P) et que cette dernière est pratiquement nulle (K_{-1}>>>>K_2), alors la réaction s'écrit comme suite **[47]:**

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

Cette hypothèse permet d'établir l'expression de la vitesse de la réaction enzymatique qui est donnée par l'équation suivante **[48]:**

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]_0}{K_M + [S]_0}$$

Cette équation est appelée de Michaelis-Menten où **[47,48]:**

- V_{max} est la vitesse de la réaction lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont complexées au substrat (l'enzyme est à saturation) : $V_{max} = K_2 [E]_0$
- K_M est la concentration de substrat lorsque la moitié des molécules d'enzymes sont complexées au substrat (l'enzyme est à demi-saturation) :

$$K_M = K = \frac{[E][S]_0}{[ES]}$$

Cette démonstration met au point plusieurs conclusions :

- La représentation $v_0 = f([S]_0)$ est de type hyperbolique **(Figure. III.1)** ;
- La vitesse maximale initiale V_{max} atteinte pour une concentration $[E]_0$ et pour une concentration très grande de $[S]_0$ devant K_M ;
- La constante de Michaelis-Menten, est égale à la concentration de substrat S correspondant à $v_{max}/2$.

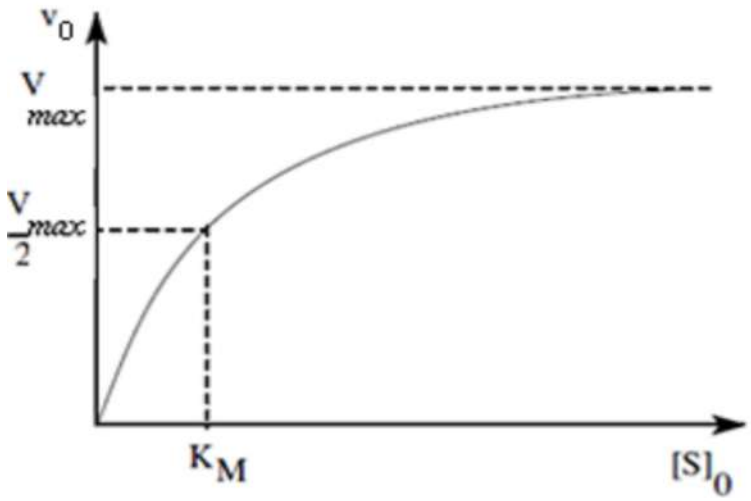


Figure III-1: Représentation graphique d'une cinétique Michaelienne **[43].**

III.3.2. Détermination des constantes cinétiques

La détermination graphique directe de V_{max} et K_M n'est pas toujours précise, et d'autres méthodes ont été proposées. Elles reposent sur une linéarisation de l'équation Michaelis-Menten. En prenant l'inverse de la vitesse on obtient :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{KM}{Vmax\,[S]_0} + \frac{1}{Vmax}$$

Cette écriture de l'équation de Michaelis-Menten est appelée représentation de Lineweaver-Burk. La représentation graphique $1/V_0 = f(1/[S]_0)$ est une droite de pente K_M/V_{max} (**Figure III.2.A**). Une autre représentation a été proposée par Eadie-Hosftee. En écrivant l'équation de vitesse sous la forme suivante **[43]:**

$$\frac{V_0}{[S]_0} = \frac{Vmax}{KM} - \frac{V_0}{KM}$$

La représentation graphique de $V_0/[S] = f(V)$ est une droite de pente $-1/K_M$ (**Figure**. **III.2.B**)

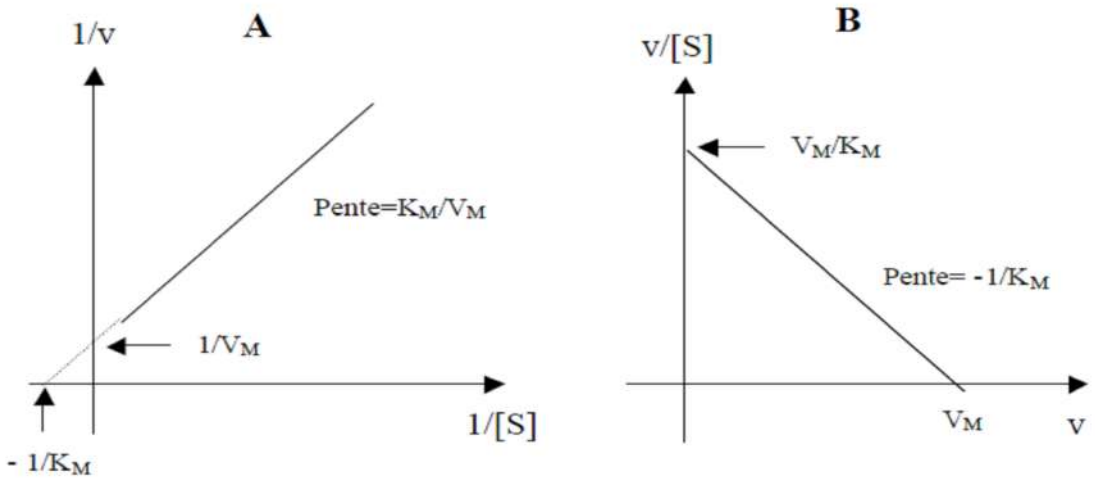


Figure III-2: Représentation graphique de linéarisation de l'équation de Michaelis –Menten, A : selon Lineweaver-Burk, B : selon Eadie-Hosftee **[43].**

III.4. Cinétique enzymatique 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 peut 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 **[49,50]** :

III.4.1. Réactions séquentielles

Où 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 **[50]**.

Il y a deux sortes de réactions dans l'addition des substrats **[49]**.

- **Mécanisme séquentiel au hasard :** Si les sites de fixation sont les deux accessibles à la surface de l'enzyme, l'ordre de fixation n'est pas ordonné.
- **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.

III.4.2. 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 **[50]**.

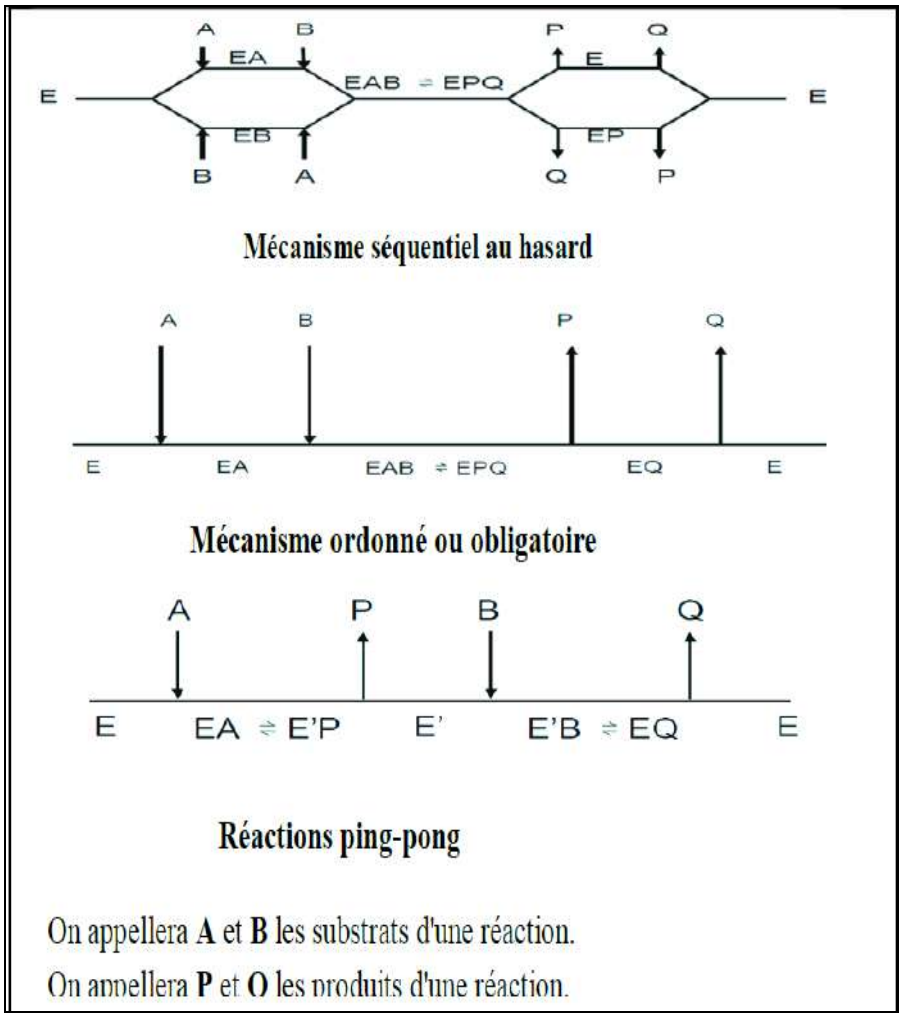


Figure III-3 : Différents mécanismes de réactions enzymatiques à deux substrats **[50].**

III.5. Unités d'activité enzymatique

L'activité d'une enzyme est obtenue par la mesure de la vitesse d'une réaction qu'il catalyse dans des conditions définies, et puisque cette vitesse varie avec la concentration d'enzyme, il est utile de définir une unité indépendante de la concentration d'enzyme : soit l'activité spécifique (par un milligramme d'enzyme et par unité de temps), ou l'activité moléculaire (nombre de molécules de substrats catalysés par molécule d'enzyme et par unité de temps), mais dans le cas où l'enzyme n'est pas purifiée, il est utile de définir l'unité d'activité catalytique, ou l'unité d'activité enzymatique. L'IUPAC (international Union of Pure and Applied Chemistry) ET l'IUB (International Union of biochemistry) recommandent l'adoption d'une unité international U.I. **[43].**

L'unité internationale U.I est définie comme la quantité d'enzyme qui transforme une micromole (1 µmole) de substrat par minute. Une autre définition de l'unité d'activité

enzymatique est le Katal. Un Katal est la quantité d'enzyme qui catalyse la conversion d'une mole de substrat en produit en une seconde **[46].**

III.6. Effecteurs influençant l'activité enzymatique

III.6.1. Effecteurs physicochimiques

Température : Elle a deux effets sur la réaction enzymatique (**Figure. III.4.A**): Elle accélère toutes les réactions chimiques, en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière due à l'énergie d'activation. Elle entraine progressivement la dénaturation de la protéine (destruction des structures secondaires et tertiaire), donc sa désactivation **[47].**

pH : Le résultat de l'effet de pH sur l'activité enzymatique donne une courbe « en cloche » (**Figure. III.4.B**). Cette courbe passant par une valeur maximale pour un pH dit PH optimal, le pH optimal de la plupart des enzymes est voisin de la neutralité.

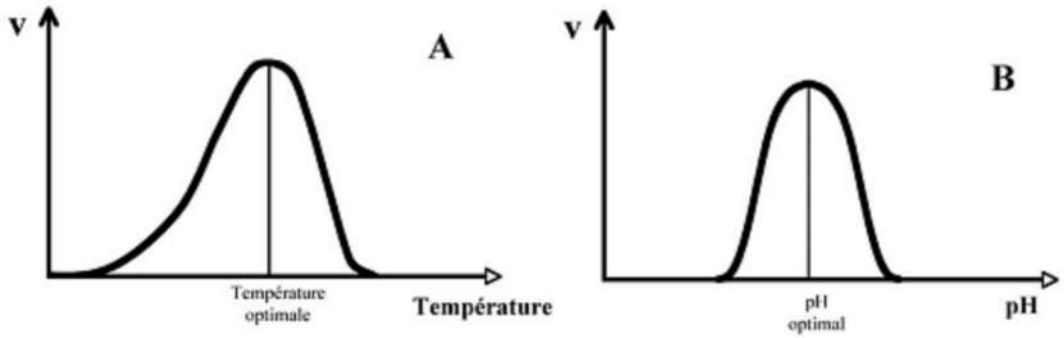


Figure III-4 : Effets de température (A) et de pH (B), sur l'activité enzymatique **[47].**

III.6.2. Effecteurs chimiques

On distingue les inhibiteurs, qui diminuent l'activité enzymatique, et les activateurs qui l'augmentent.

Les activateurs : sont de petites molécules qui s'associent à l'enzyme ou au complexe enzyme-substrat par exemple : **Mg^{++}, Zn^{++}** et qui augmentent relativement son activité.

Les inhibiteurs : L'inhibiteur est une molécule qui se fixe à une enzyme et interfère avec son activité, en empêchant la formation ou la décomposition du complexe enzyme-substrat **[48].**

IV. Immobilisation des enzymes

IV.1. Définition de l'immobilisation

Pour compenser les problèmes liés à l'instabilité et au cout d'extraction des enzymes en solution, on cherche à les immobiliser sur des supports insolubles afin de pouvoir les réutiliser après l'opération, et de faciliter leur séparation du produit de réaction obtenu. Par ailleurs, les enzymes immobilisées se prêtent mieux à leur incorporation dans les réacteurs où l'entrée de substrat à un bout permet de récupérer le produit transformé à l'autre bout en flux continu **[43].** Les enzymes immobilisées sont définis comme des enzymes physiquement limitée ou localisée dans une région définie de l'espace avec la rétention de leur activité catalytique **[6].**

IV.2. Techniques d'immobilisation

Plusieurs techniques d'immobilisation existent :

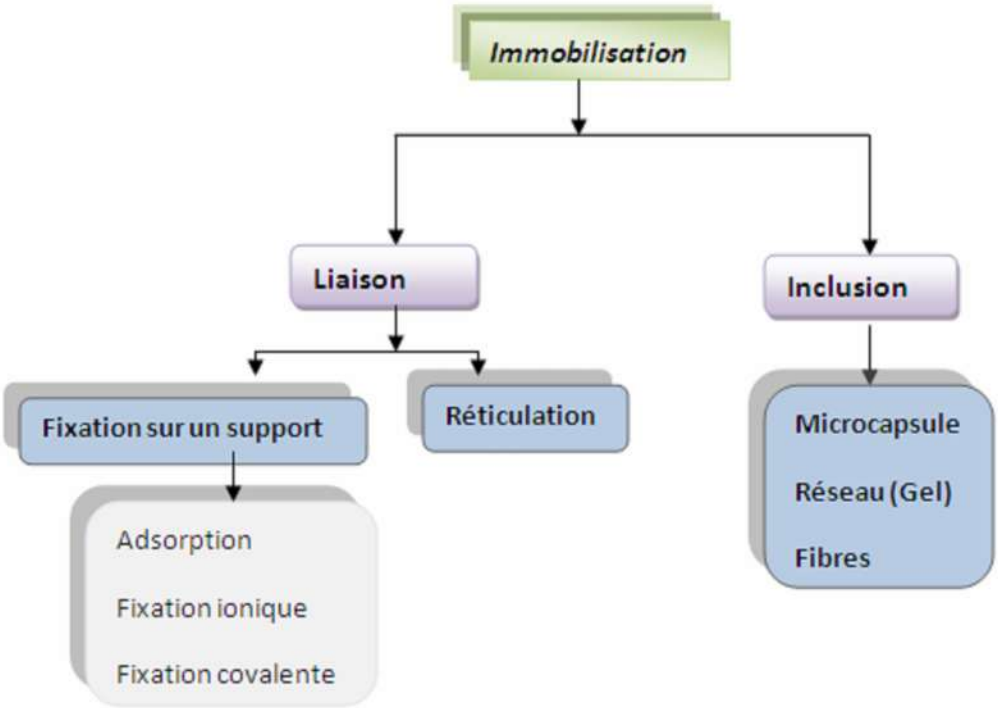


Figure IV-1 : Classification des différentes techniques d'immobilisation **[51].**

IV.2.1. Immobilisation par inclusion

Les molécules d'enzyme sont retenues dans le réseau tridimensionnel d'un polymère insoluble dans l'eau, dans une fibre creuse ou emprisonnées dans les microcapsules délimitées par une membrane semi perméable dont les pores sont suffisamment larges pour permettre le passage des molécules du substrat ou des produits de la réaction.

Ces procédés d'immobilisation permettent de piéger de fortes quantités d'enzyme mais le désavantage réside dans la difficulté pour le substrat de diffuser rapidement vers l'enzyme **[51].**

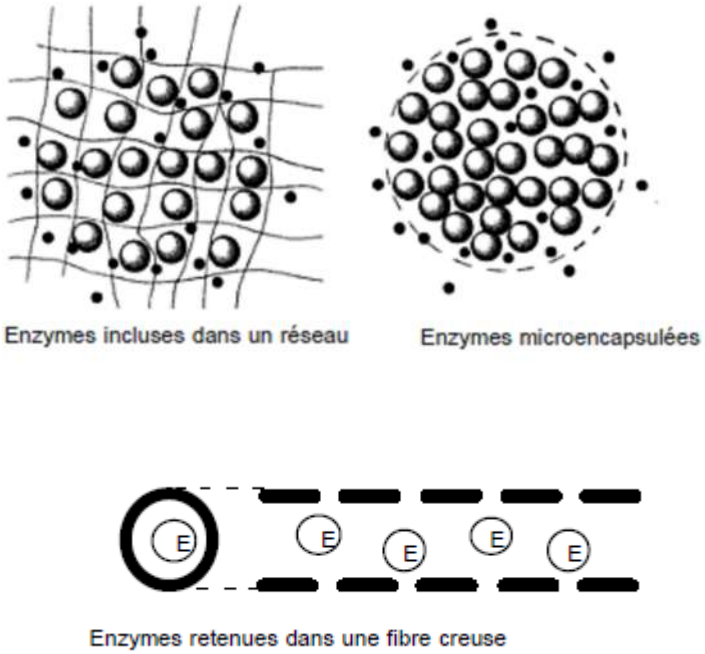


Figure IV-2 : Techniques d'immobilisation par inclusion **[43,52].**

IV.2.2. Immobilisation par liaison

IV.2.2.1. Liaison à un support

La liaison à un support est la technique d'immobilisation la plus ancienne. Dans cette technique, la quantité d'enzyme lié au support et l'activité après l'immobilisation dépend de la nature de support. La sélectivité du support dépend de la nature de l'enzyme lui-même ainsi de 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 **[53]** :

- **Adsorption** : la fixation est réalisée grâce aux liaisons secondaires (van der Waal, liaison hydrogène) qui s'établissent entre des groupements d'atome d'enzyme et des groupements de support .la fixation est réversible, non spécifique et les risques de désorption de l'enzyme sont important **[54].**



Figure IV-3 : Techniques d'immobilisation par adsorption **[54].**

- **Fixation ionique** : la fixation ionique s'effectue grâce à une liaison ionique entre la protéine enzymatique et le support lipophile qui contient des résidus échangeur des ions. La fixation au support est facile mais elle cause des changements dans la conformation de l'enzyme et son site actif **[53].**

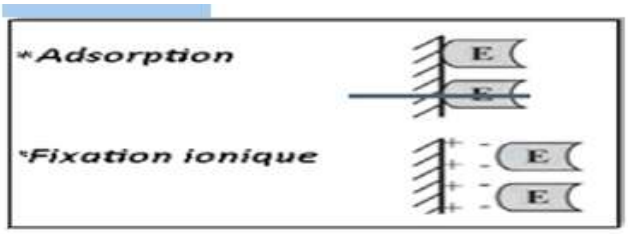


Figure IV-4: Modes de fixation non covalente à un support **[51].**

- **Fixation covalent** : la fixation covalente est basé sur l'adhésion d'enzyme est le support par des liaisons covalentes, les conditions d'immobilisation par liaison covalente sont plus compliqués que celles pour la fixation ionique et l'adsorption .ainsi, cette liaison peut altérer la structure et le site actif d'enzyme ; résulte dans la majorité des cas une diminution d'activité et/ou un changement de substrat mais en s'assurant qu'il n'y a pas une fuite des enzymes car la liaison enzyme-support est très fort **[53].**

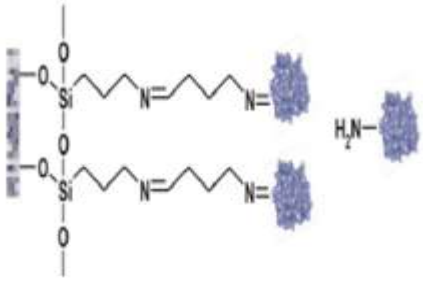


Figure IV-5 : liaison covalente entre l'enzyme et le support **[53].**

IV.2.2.2. Réticulation

Cette méthode est basée sur la formation des liaisons covalentes entre les molécules d'enzyme par adition des agents chimiques (dans la plus part de temps on utilise le glutaraldéhyde).

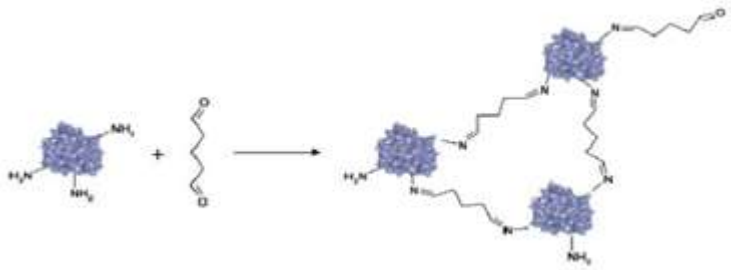


Figure IV-6 : Immobilisation des enzymes par réticulation **[55].**

La réticulation d'enzyme est insuffisante, très chère et provoque en général une diminution parfois importante de l'activité enzymatique suite à la présence d'agents de réticulation qui sont des inhibiteurs irréversibles tel que le glutaraldéhyde. Pour cela, elle est utilisée en conjonction avec les autres méthodes. Son principal avantage est l'augmentation de la stabilité des enzymes adsorbés et la diminution de la fuite à partir de gel formé **[53].**

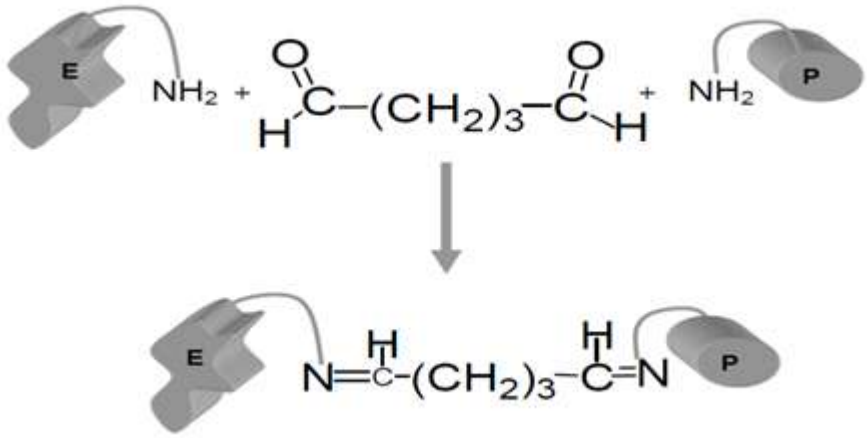


Figure IV-7: Le principe de la réticulation avec le glutaraldéhyde **[55,56].**

IV.3. Propriétés des enzymes immobilisées

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

IV.3.1. 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 **[57].** 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 **[58].**

IV.3.2. 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 **[59].**

IV.4. 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 :

- 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 (**Tableau IV.1**) **[60].**

Tableau IV-1 : Classification des supports d'immobilisation **[60].**

Organique	**Les polymères naturels** ✓ Polysaccharides : cellulose, dextrine, agar, agarose, la chitine, alginate. ✓ Protéine : collagène, albumine.
	Les polymères synthétiques ✓ Polystyrène ✓ Autre polymères : polyacrylate, polyacrilamide, polyvinyle.
Inorganique	**les minéraux naturels** ✓ Bentonite, silice
	Les matériaux traités ✓ Verre, métaux, les oxydes métalliques poreux.

V. LES PEROXYDASES

V.1. Généralités

Les peroxydases ont requis une position avancée dans les domaines de recherche biotechnologique (enzymologie, biochimie, génétique…etc.). Ils sont l'un des enzymes les plus étudiés grâce à la diversité de leurs aspects quantitatifs et qualitatifs. Les peroxydases sont des enzymes universelles du monde vivant. Ce sont des hémoprotéines, partagent avec d'autres protéines une structure chimique appelée hème. Les peroxydases possèdent un poids moléculaire varie entre 30 et 150 KDa, catalysent des réactions d'oxydoréduction impliquant la réduction d'un peroxyde et l'oxydation d'un substrat, variable d'une classe de peroxydase à une autre **[61].**

L'hème des peroxydases est constitué par une métalloporphyrine dont l'ion métallique est le fer ferrique ($Fe^{3+)}$ associé à quatre atomes d'azote du noyau tétrapyrrole par quatre liaisons de coordination **(Figure. V.1**) **[62].**

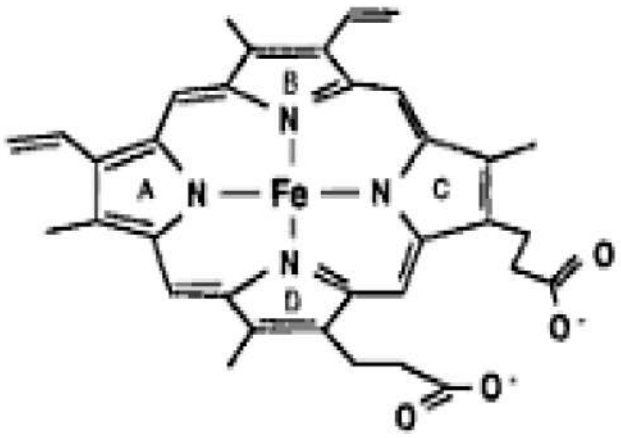


Figure V-1: Ferriprotoporphyrine IX ou hème b. (A, B, C, D) représentent les quatre noyaux Pyrroles **[62].**

V.2. Classification

On distingue deux grandes familles de la peroxydase : les peroxydases animales, principalement détectées chez les animaux, et, par opposition, les peroxydases non animales détectées chez les plantes, les champignons, les bactéries et les protistes. Les peroxydases non animales sont actuellement sous divisées en 3 classes **[59] :**

- **Classes I :** contenant la peroxydase des procaryotes tel que : les Catalase Peroxydases, les Ascorbates Peroxydases et les Cytochrome c Peroxydases.
- **Classes II :** uniquement détectées chez les champignons, qui sont capables de dégrader la lignine. On distingue : Lignine peroxydase (LiP), manganèse peroxydase (MnP) les deux sont produites par les champignons de la pourriture blanche.
- **Classes III :** présentes seulement chez les plantes tel que : raifort (*Armoracia rusticana*), pêche (*Prunus persica*), Pomme de terre (*Alocasia macrorhiza*), artichaut (*Cynara scolymus L*), navet (*Brassica rapa*), courgette (*Cucurbita pepo*) **[51, 62].**

V.3. Cycle catalytique de peroxydase

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

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. Dans cette dernière étape, le composé I contient un centre oxyferryl avec un fer sous l'état ferryl (FeIV = 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 **[63].**

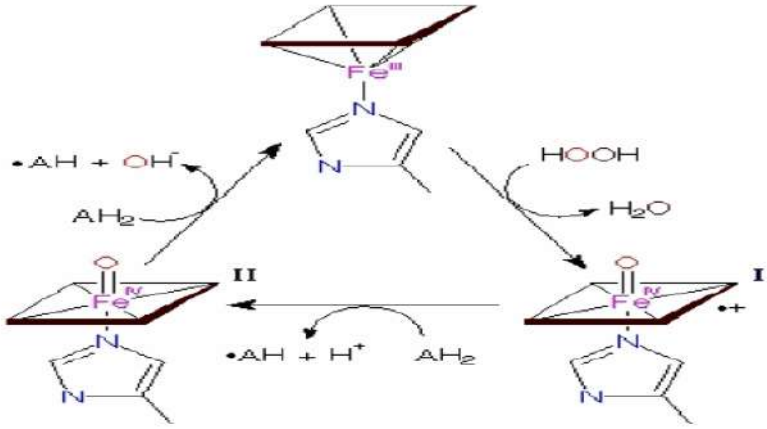


Figure V-2 : Mécanisme réactionnel de la peroxydase **[64].**

V.4. Applications industrielles

Grace à leur grande diversité, les peroxydases ont été utilisées pour plusieurs applications industrielles, on site :

V.4.1. Décoloration des colorants synthétiques

A nos jours, plus de 100 000 colorants commerciaux existent dans les marchés internationaux, avec une production de plus de 7.10^5 tons par an**.** Ces colorants sont conçus d'une manière qu'ils soient stables et résistant à tout type d'attaque microbienne ou à l'oxydation. En effet, Plusieurs activités industrielles utilisent ces colorants. En parallèle, ils consomment des grandes quantités des eaux ce qui génère un large volume des effluents colorés plus au moins concentrés **[65].** La résistivité et les propriétés de ces colorants rendent les méthodes traditionnelles de traitement insuffisantes et inefficaces.

Plusieurs auteurs ont montré que la destruction des composés colorés est stimulée de façon significative par des enzymes oxydatives. Ces colorants contient dans leurs structure des arrangements aromatiques ce qui leurs fait des substrats agréables pour les différentes types de la peroxydase. Récemment**,** ont montré que la peroxydase de raifort HRP peut être efficace dans la dégradation et la précipitation des colorants azoïques importants **[66].**

V.4.2. Traitement des composés phénolique

les peroxydases sont connues aussi pour polymériser certains composés organiques récalcitrants tels que le phénol et les phénols substitués (qui sont largement présents avec des concentrations variables dans les eaux usées des raffineries de pétrole et de nombreuses autres

industries, y compris les plastiques, textiles, fer, acier et les industries forestières), selon la réaction de Polymérisation suivante:

$$H_2O_2 + 2AH_2 \xrightarrow[\text{Peroxidase}]{} 2H_2O + \text{polymerized}$$

V.4.3. Synthèse organique

Les radicaux libres produits par le cycle catalytique de la peroxydase peuvent participer aux différentes réactions post-enzymatiques. La polymérisation oxydante des composés aromatiques par les oxydoréductases a été étudiée pour créer des nouveaux polymères fonctionnels et pour synthétiser des résines phénoliques. Cela peut être réalisé sans l'aide de formaldéhydes toxiques, qui doivent être utilisés dans la polymérisation chimique **[66].**

V.4.4. Biocapteurs à base de la peroxydase

Un domaine qui offre un grand potentiel pour les applications de la peroxydase comprenant les biocapteurs électrochimiques. Récemment, les électrodes à base de la peroxydase ont avait largement utilisé dans les systèmes d'analyse pour la détermination du peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes organiques. Sous l'état immobilisé, avec une enzyme produisant du peroxyde d'hydrogène, ils peuvent être exploités pour la détermination du glucose, des alcools, glutamate et la choline.

V.4.5. Application pour analyse et diagnostique

Le lactose contenu dans les produits laitiers est déterminé par différentes méthodes analytiques nécessitant des personnes formées et des instruments sophistiqués tels que un spectrophotomètre, les biocapteurs, etc., a mis au point un BIOSTRIP simple et économique pour l'estimation de lactose en immobilisant la β-galactosidase, le galactose oxydase et le HRP sur un support polymère, pour détecter le lactose. Le BIOSTRIP est plongé dans du lait ou un produit laitier et la couleur développée à partir d'un chromogène ajouté, est utilisée pour estimer le lactose dans la gamme de concentration <20-100 g / l **[66].**

VI. Bioréacteurs ou Réacteurs Enzymatiques

VI.1. Définition

Construits en général sur les mêmes modèles que les réacteurs chimiques, ce sont des cuves ou enceintes en verre (pour les modèles de laboratoire) ou en acier inoxydable. Ils sont pourvus pour réaliser des réactions enzymatiques (réacteurs enzymatiques) ou des réactions à cellules (fermenteurs). Les réacteurs biologiques sont aussi appelés bioréacteurs **[67].** Les bioréacteurs sont conçus tel qu'ils doivent assurer **4 grandes fonctions** :

- bons transferts de matière
- bon transfert de chaleur
- maintien de la stérilité
- suivi des paramètres et conduite de régulations

VI.2. Principe de choix de bioréacteur

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 **[68].**

VI.3. Principe de dimensionnement de bioréacteurs

Lors de la mise en œuvre d'une bioréaction, la première étape consiste à dimensionner les différents éléments constitutifs du bioréacteur en vue d'optimiser le procédé. Dans le génie chimique et biochimique, l'opération de mélange est le paramètre critique du procédé responsable des phénomènes de transferts intervenant au sein du réacteur **[68].**

VI.4. 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. Selon leurs applications, les réacteurs à enzymes immobilisées fonctionnement soit en discontinu ou en continu **[68].**

VI.4.1. Fonctionnement discontinus (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 fermée agitée 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, généralement, par filtration, par centrifugation ou par précipitation. Malgré sa simplicité, ce type de réacteur comporte plusieurs inconvénients inhérents aux réacteurs fermés tels que la variabilité de la qualité des produits, le coût de main d'œuvre lié à 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 nécessité d'une étape supplémentaire de séparation des enzymes du milieu réactionnel **[69].**



Figure VI-1: Bioréacteur de fonctionnement discontinu avec l'enzyme immobilisée (Bioréacteur agité) **[70].**

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'œuvre 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 **[71].**

VI.4.2. Fonctionnement continus

Il existe, par ailleurs, plusieurs types de réacteurs enzymatiques qui fonctionnent en continu. Parmi les différents réacteurs continus on distingue : les réacteurs continus parfaitement agité, Les réacteurs à lit fixe, Les réacteurs à lit fluidisé, Les réacteurs

membranaires (REM). Notons que les trois derniers types sont considérés comme étant des réacteurs en fonctionnement piston **[68].**

VI.4.2.1. 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. VI.2 et Fig. VI. 3) [65].**

VI.4.2.1.1. Bioréacteurs à lit fixe

Un autre moyen d'augmenter la concentration bactérienne ou d'améliorer l'activité de l'enzyme consiste à les fixer sur des supports. Le support d'immobilisation est des particules ou billes sur lesquelles sont immobilisés des cellules ou des enzymes. Il est compacté dans une colonne à travers laquelle le milieu peut être injecté. Les deux extrémités du réacteur sont fermées par des grilles ou des plaques perforées et permettant la percolation d'une phase liquide, mais empêchant tout mouvement de la phase solide dispersée. L'alimentation peut se faire de bas en haut ou de haut en bas selon le type de construction.

Le réacteur à lit fixe permet à la fois d'avoir une importante productivité et un produit final exempt d'enzymes étant donné que celles-ci sont confinées dans le réacteur, évitant ainsi une étape finale de séparation du biocatalyseur et du produit. Le réacteur à lit fixe constitue la configuration classique utilisée dans la conduite de réactions catalytiques hétérogènes à grande échelle. 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 di fusionnelles ce qui réduit ses performances **[68].**

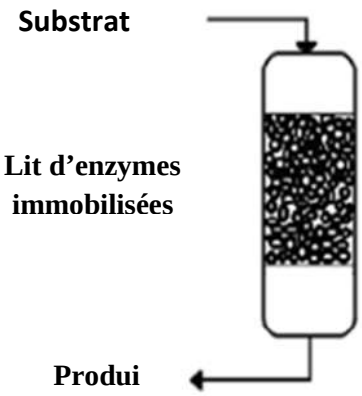


Figure VI-2: Construction de quelques types de bioréacteur à lit fixe **[69].**

VI.4.2.1.2. Réacteur à lit fluidisé

Les particules support avec leurs cellules fixées (ou enzymes) sont en mouvement, fluidisées par un flux d'écoulement. Il est constitué d'un tube de section circulaire rempli de particules solides actives, mais forcément placé verticalement et dont seule une extrémité est fermée par une grille ou une plaque perforée. L'activité est assurée par des bactéries ou des enzymes qui sont fixées sur un support mobile, particules granulaires fines et poreuses comme le sable ou le charbon actif. La phase liquide traverse le réacteur de bas en haut et comme les particules solides ne sont pas confinées, dès que la vitesse superficielle du liquide dépasse la valeur appelée vitesse minimale de fluidisation, le lit s'expansé et les particules solides se déplacent librement à l'intérieur de la suspension liquide-solide. On dit alors que le lit est fluidisé; les particules solides sont animées d'un mouvement du flux ascendant rapide et régulier de l'effluent qui assure leur mélange. Ce système minimise les phénomènes de colmatage des colonnes et d'emprisonnement des gaz produits. Il assure un meilleur transfert de matière et de chaleur **[67].**

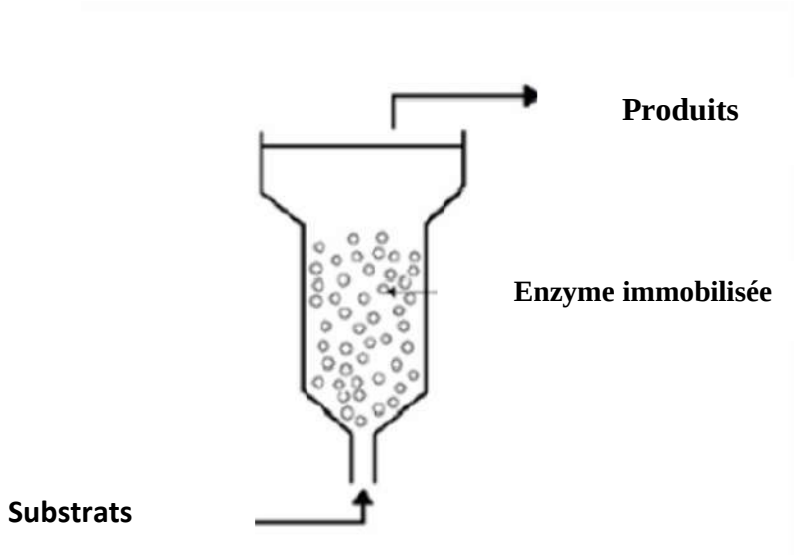


Figure VI-3: Construction de quelques types de bioréacteur à lit fluidisé **[67].**

VI.4.2.2. 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 **[69].** Plusieurs géométries et configurations de membranes sont utilisées à l'échelle du développement de laboratoire ou de production industrielle **[72].** :

Un système de membranes de micro ou ultra-fitration est alors couplé au procédé. Il existe deux grands types de bioréacteurs à membrane : les bioréacteurs à membrane "à boucle externe" (les membranes se situent alors à l'extérieur du réacteur) (**figure VI-4-a**) et les bioréacteurs à "membranes immergées" (**figure VI-4-b**).

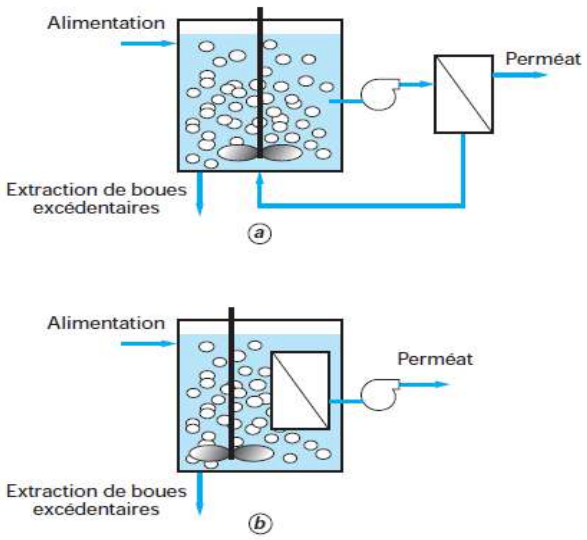


Figure VI-4*:* Schéma des deux types de bioréacteurs à membrane : (a) à boucle externe et (b) à membrane immergée **[72].**

VI.5. 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

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 **[71].** Donc, en appliquant la formule ci-dessus on trouve :

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

$$F.C - F\,(C+dC) - v_0\,\eta\,dV\,(1-\varepsilon)=0$$

Cette équation devient comme suit

$$F\,dc = -\,v_0\,\eta\,(1-\varepsilon)\,dv \qquad \ldots\ldots(5)$$

Tel que :

C : concentration du substrat en mol/L

F : 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 $\eta = \frac{V\text{immobilisé}}{V\text{libre}}$

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 :

$$V_0 = \frac{Vmax\ [S]0}{Ks+[S]0} \text{..... (8)}$$

Le volume du bioréacteur sera déterminé comme suit :

$$V = \frac{Ks*ln\left(\frac{So}{S}\right)+[S]0-[S]}{Vmax\eta(1-)}F \text{..... (9)}$$

VI.6. Calcul de bioréacteur mécaniquement agité

La cuve mécaniquement agitée est le réacteur choisi lorsque tous les acteurs de la bioréaction (substrats, enzymes, micro-organismes) sont dans une phase liquide unique. Sous réserve d'une agitation suffisante pour que la phase liquide soit parfaitement mélangée, le seul phénomène à prendre en compte dans le dimensionnement et la conduite du bioréacteur est la vitesse de la bioréaction. La cuve agitée est employée pour effectuer des réactions enzymatiques avec des enzymes en solution ou encore des fermentations anaérobies. Dans ce dernier cas, le gaz carbonique produit se désorbe du milieu de culture sous forme de bulles, mais sa concentration en phase liquide, constante et donnée par la loi de Henry, n'intervient pas, en général, dans l'expression de la vitesse de croissance du micro-organisme **[72].**

Le volume du bioréacteur agité sera déterminé en appliquant la formule suivante :

$$FS_0 - FS - rs.\ v = 0$$

$$FS_0 - FS = rs.\ V$$

- Si la réaction est Michaelienne ayant la formule suivante :

$$V_0 = \frac{Vmax\ [S]0}{Ks + [S]0} \quad \text{……..……(10)}$$

Avec

- V_0 (mole l^{-1} s^{-1}) vitesse de la réaction,
- v_{max} (mole l^{-1} s^{-1}) vitesse maximale de la réaction,
- Ks (mol/l) constante de Michaelis et Menten,
- $[S]_0$ (mol/l) concentration en substrat.

$$FS_0 - FS = \frac{Vmax\ S}{Ks + s} V\ \eta \quad \text{……(11)}$$

$$(S_0\text{-}S)(Ks+S) = Vmax\ S\ \frac{V}{F}\ \eta \quad \text{……..(12)}$$

$$X = \frac{S0 - S}{S0} \text{……..……..(13)}$$

$$S_0 - S = X\ S_0$$

$$S = S_0\ (1\text{-}X)$$

$$X\ S_0\ (ks + S_0\ (1\text{-}X)) = \eta\ \ Vmax\ (1\text{-}X)\ S_0\ \frac{V}{F} \text{……(14)}$$

$$\frac{X}{1-X} + \frac{S0\ X}{KS} = \eta\ \ \frac{S0}{Ks}\ X = \eta\ \ \frac{Vmax}{KS}\ \frac{V}{F}\ \eta \quad \text{……(15)}$$

Le volume du bioréacteur agité :

$$V = \frac{F\ Ks}{Vmax}\ [\frac{X}{1-X} + \frac{S0}{Ks}\ X] \text{……..(16)}$$

Partie B :

Étude expérimentale

Objectif

L'objectif de cette partie expérimentale est l'étude de la dégradation d'un colorant azoïque. Le Noir ériochrome T (NET), par la peroxydase extraite à partir d'une source végétale, sous forme immobilisée, dans deux types de bioréacteurs continus, l'un mécaniquement agité tandis que l'autre est à lit fixe.

La stratégie expérimentale de cette étude passe dans un premier temps par l'extraction, la purification et l'immobilisation de l'enzyme. La peroxydase utilisée est extraite à partir d'une source végétale qui est le navet blanc, puis purifiée en utilisant un solvant organique « l'acétone ». L'enzyme sera immobilisée par inclusion dans l'alginate de calcium.

La suite de l'étude sera basée sur la variation d'un seul facteur pour étudier l'effet des facteurs techniques tel que : le débit, la concentration du substrat (colorant) et le temps de fonctionnement sur la performance d'élimination du colorant dans les deux types de bioréacteurs.

VII. PRODUITS ET MATÉRIEL

VII.1. Produits utilisés

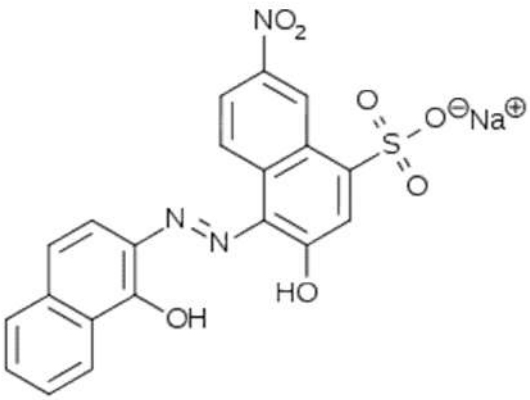
VII.1.1. Source de la peroxydase

La peroxydase est obtenue du navet blanc « *Brassica rapa* », local, très disponible dans le marché algérien.

VII.1.2. Substrats de la peroxydase

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

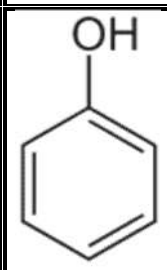
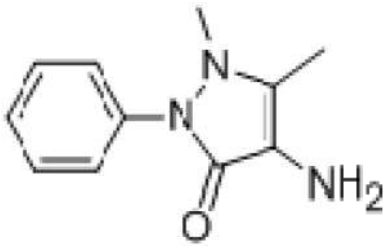
Tableau VII-1: Propriétés du noir ériochrome T **[73].**

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
Odeur	Inodore

VII.1.3. Réactifs utilisés dans le test standard de mesure de l'activité enzymatique

Les Réactifs utilisés dans le test standard de mesure de l'activité enzymatique sont résumés dans le tableau VII.2 :

Tableau VII-2 : Propriétés des réactifs de dosage de l'activité enzymatique **[74].**

Réactif / **Propriétés**	**Phénol (Substrat)**	**Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 a (30%) (substrat principale)**	**4aminoantipyrine (chromogène)**
Aspect	poudre	Liquide	Solide jaune
Odeur	+	+	+
Formule Brute	C_6H_6O	H_2O_2	$C_{11}H_{13}N_3O$
Formule Développée			
Solubilité dans l'eau	98g-1	76,04 $g \cdot l^{-1}$	500 g/L (20 °C)
Masse molaire (g/mole)	94,11	34,01	203,29
Point de fusion	-33°C	43°C	-
Point d'ébullition	182°C	108°C	-

VII.1.4. Solvant de purification

Le solvant de purification utilisé est l'Acétone, C_3H_6O (85%), M= 58.078 g/mole, d = 0.819.

VII.1.5. Produits utilisés dans le dosage des protéines

- Protéine standard **:** solution d'albumine bovine SAB.
- Réactif de Bradford ; composé par :
  - Bleu de Coomassie 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.

VII.1.6. 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.

VII.1.7. 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 $KH_2\ PO_4$ **0.01M** et ajusté par NaOH **0.2M.**

VII.2. Matériel utilisé

Le matériel utilisé est résumé dans le tableau VII.3 :

Tableau VII-3 : Equipements et verrerie utilisés

Equipements	**Verrerie**
Spectrophotomètre UV –Vis (PERKIN-ELMER 550 A).	Fioles jaugées
Centrifugeuse.	Pipettes
pH-mètre.	Béchers.
Etuve	Cristallisoir.
Mixeur.	Eprouvettes
Balance	Burettes
pompe péristatique	Tubes à essai.

Agitateur, Agitateur a Hélice	Erlenmeyers.

VIII. EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA PEROXYDASE

VIII.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 organismes supérieurs. Pour notre étude, on s'intéresse à la peroxydase des plantes, particulièrement à la peroxydase extraite du navet blanc (*Brassica rapa*), 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 **[75]** : 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 (Figure. VII.1). L'extrait obtenu est considéré comme source de la peroxydase brute. Il est conservé immédiatement sous 4°C pour des utilisations ultérieures.

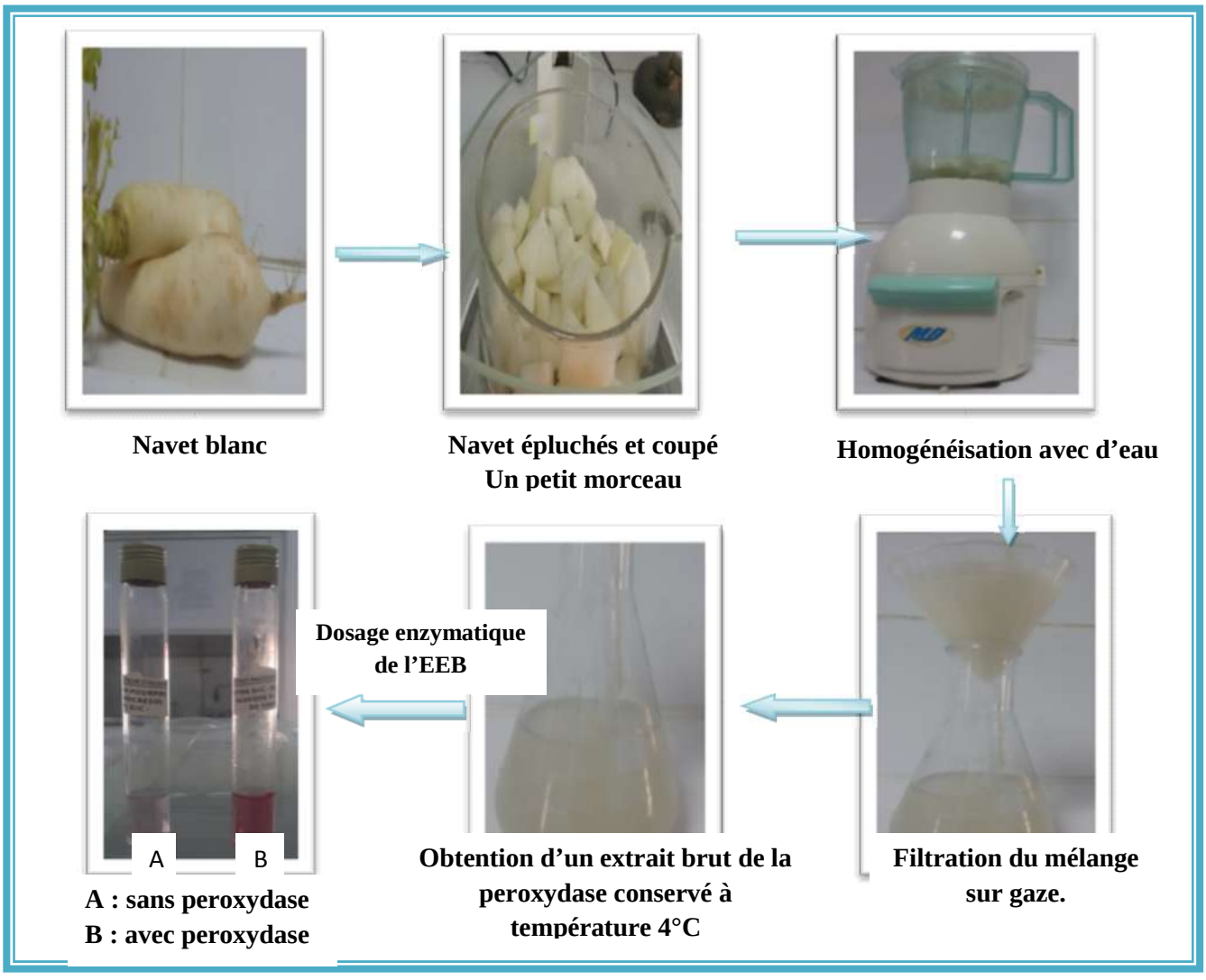


Figure VIII-1: Protocole d'extraction de la peroxydase à partir du navet.

VIII.2. Purification de la peroxydase par précipitation à l'acétone

La purification par précipitation à 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 **[75],** disposée sous agitation dans le glace pilée. Une fois le mélange versé, on le conserve dans le réfrigérateur pendant 2h. Il forme alors un précipité blanc. Sa récupération se fait par centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min le culot riche en -peroxydase est dissous dans 50 ml de solution tampon pH6. Les étapes de la purification sont illustrées dans la figure ci-dessous (**Figure VIII-2**).



1-Addition de l'acétone

2 /conservation du melange à 4°C





3-Centrifugation du mélange.

5 /dissolution de la masse récupérée dans un volume de 50 ml d'une solution tampon pH=6



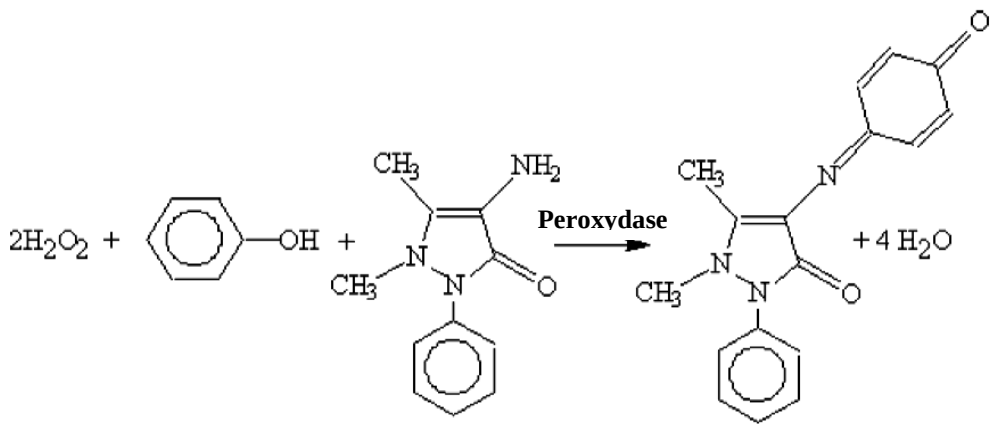


4-Formation du culot

Figure VIII-2 : Protocole de purification de la peroxydase du navet par précipitation à l'acétone.

VIII.3. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique des extraits a été dosée en se basant sur la réaction entre phénol et le peroxyde d'hydrogène en présence de 4-Aminoantipyrine et la peroxydase, le produit formé au cours de cette réaction est un chromogène de Quinoneimine **[76]**.



Phénol (substrat incolore) **4-aminoantipyrine (chromogène** **Quinoneimine (produit Rose)**

Figure VIII-3 : Réaction entre le phénol et la peroxydase de d'hydrogène en présence de 4-amino-antipyrine et la peroxydase **[75].**

Le Quinoneimine présente des caractéristiques d'absorption particulières dans la gamme visible à une langueur d'onde maximale de 517 nm ce qui permet de mettre en œuvre une technique de mesure d'activité enzymatique en continu ,la vitesse initiale est alors déterminée à partir de la pente de la partie linéaire initiale de la courbe obtenue .Le mélange réactionnel utilisé pour doser cette activité est préparé dans une fiole de 50 ml, il 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. **[75].** L'intensité de la couleur est convertie en concentration en utilisant un

coefficient d'extinction de 6499 $mol^{-1} \cdot l \cdot cm^{-1}$ **(voir annexe II).**

VIII.4. Calcul de l'activité enzymatique des deux extraits enzymatiques

L'avancement de la réaction est déterminé par la mesure de l'absorbance à 517 nm, son augmentation 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 obtenues 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).** La courbe d'étalonnage est faite par un dosage de substrat peroxyde d'hydrogène mais pour des solutions très diluées. Grace à des réaction qui mettent en œuvre l'enzyme « peroxydase »,on dose le produit coloré après une transformation totale de H_2O_2. Dans ce cas, l'enzyme n'est qu'un réactif particulier utilisé pour déterminer la fonction entre l'absorbance et la concentration de H_2O_2. Le coefficient d'extinction molaire obtenu à partir de la courbe d'étalonnage par la relation de Beer-Lambert est égal à 6499 $mol^{-1} \cdot l \cdot cm^{-1}$ **(voir annexe A.2)**.

Le tracé de l'évolution de la 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 (Figure VIII-4) :

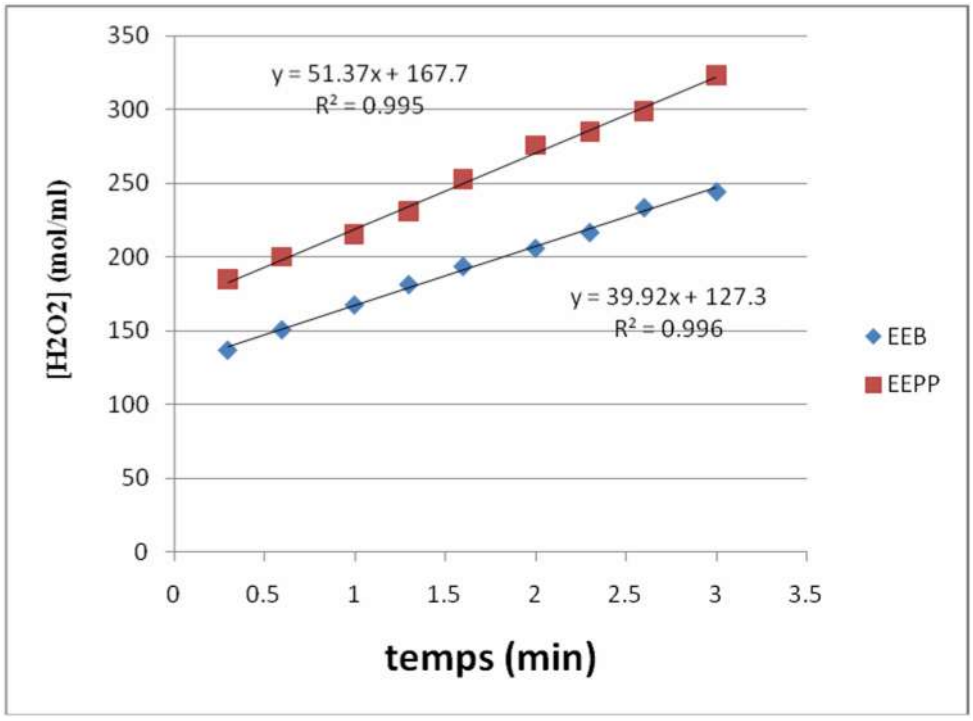


Figure VIII-4 : Activité enzymatique pour les deux extraits: EBB, EEPP.

VIII.5. Dosage de la quantité de protéines

Durant toutes ces étapes, il est essentiel d'évaluer les deux facteurs clés : la pureté de l'enzyme exprimée en activité et le Rendement de purification. Pour cela, on dose, avant et après la purification, la quantité totale de protéines par la méthode de biuret et l'activité enzymatique de la peroxydase par le test standard pour les deux extraits.

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 :

$$\mathbf{DO=0.0041\ [SAB].}$$

La quantité de protéines dans les deux extraits enzymatiques brute et semi purifié est déterminée en utilisant cette équation. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau (**Tableau. VIII.1**)

VIII.5.1. Comparaison entre les deux extraits EEB, EEPP

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité de la peroxydase qui transfère 1µmol du peroxyde d'hydrogène par minute à 25°C. Cette activité est calculée à partir de la relation suivante **[76]**:

$$\mathbf{AE} = \left(\frac{dc}{dt}\right) * \frac{\text{volume du mélange réactionnel}}{\text{volume de l'enzyme injectée}}$$

En se basant sur les résultats de l'activité enzymatique et la quantité totale de protéines contenue dans les extraits, on peut évaluer les deux étapes de purification par d'autres paramètres qui sont :

- Activité spécifique$= \frac{AE}{[\text{protéine}]}$
- Le Rendement de purification : est la proportion, en %, de l'activité enzymatique de l'EEPP par rapport à l'EEB

$$\mathbf{R=} \frac{AE_{\text{aprés purification}}}{AE_{\text{avant purification}}}$$

- Le degré de purification : est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique (par rapport à la première étape) durant chacune des autres étapes de la procédure. les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau VIII-1 : Caractérisation des deux extraits avant et après la purification.

Etape	Protéines totales (mg)	Activité enzymatique (UI)	Activité spécifique (UI /mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Homogénat Initial (EEB)	**48780**	**1078,85**	**0,022**	**-**	**100**
Purification avec l'acétone (EEPP)	**11219,5**	**838,341**	**0,07**	**3.18**	**77.70**

Les résultats montrent que l'extrait enzymatique brut, obtenu à partir du navet est caractérisé par une activité catalytique totale brute de **1078,85**UI. Mais au cours de l'étape de purification par l'acétone, on remarque que cette activité chute à une valeur de **838,341 UI,** alors que l'activité spécifique augmente qui entraine l'accroissement du facteur de purification à 3.18 grâce à la diminution de la quantité de protéine après la purification (**tableau VII-4**). La purification par précipitation à l'acétone permet donc l'obtention 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 reflète sur la diminution de rendement de purification de 100% à 77.70%, cela est expliqué soit par la dénaturation de l'enzyme durant la purification ou soit par une perte d'une certaine quantité d'enzyme lors de la séparation. La purification nous permet d'obtenir une enzyme plus pure avec un aspect plus acceptable et une odeur moins intense qui pourra être conservée pour une longue durée (**figure VIII-5**)



Figure VIII-5 : Aspect des deux extraits : A) Extrait brut, B) Extrait enzymatique partiellement purifié par précipitation à l'acétone.

IX. ETUDE DE LA DEGRADATION DE COLORANT AVEC LA PEROXYDASE IMMOBILISEE

IX.1. Préparation des billes à peroxydase immobilisée

L'exploitation de la technique d'immobilisation des enzymes offre de nombreux avantages. Elle permet d'améliorer la stabilité des enzymes et de conserver leurs activités catalytiques, d'où la possibilité de leur réutilisation plusieurs fois. L'alginate est l'un des biopolymères les plus fréquemment utilisés pour l'immobilisation par inclusion, non seulement grâce à ses propriétés de gélification, mais aussi grâce à sa biocompatibilité et son coût modéré.

L'immobilisation a été réalisée selon le protocole suivant **[75]** :

- Dans un bécher, dissoudre 0.15 g d'alginate de calcium dans 10 ml de la solution de peroxydase.
- 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 (**Figure IX.1**) :



Figure IX-1 : Protocole d'immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de calcium.

IX.2. Caractérisation des billes

Après l'immobilisation, on procède à la caractérisation des billes d'alginate par la détermination de la masse et du diamètre moyen de chaque particule. L'activité enzymatique par bille a été également déterminée.

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 dont les propriétés générales sont illustrées dans le tableau suivant:

Tableau IX-1: Caractéristiques des billes d'alginate de calcium contenant la peroxydase.

Masse moyenne (g/bille)	**Diamètre moyen (mm/bille)**	**Volume moyen (mm^3/bille)**	**Masse volumique d'une bille (g/mm^3)**	**Activité catalytique (UI/bille)**
0,15	2,1	5,089	0,029	0,28

X. ETUDE DE LA DEGRADATION ENZYMATIQUE EN CONTINU DU NET DANS LES BIOREACTEURS

X.1. Calcul et conception des bioréacteurs

X.1.1. Calcul du bioréacteur à lit fixe

Le bioréacteur à lit fixe est une colonne de diamètre et de hauteur bien définis (**Figure**. **VIII.2**), rempli d'un garnissage de particules sphériques contenant l'enzyme. Le dimensionnement du bioréacteur à lit fixe se base sur les paramètres cinétiques qui caractérisent le type de réaction mise en œuvre, le coût de réalisation, et sur la quantité à produire ou à dégrader exprimée en rendement ou en concentration. Le Calcul du bioréacteur est basé sur les résultats de la cinétique de dégradation (en batch) qui a été réalisée dans une précédente étude **[77]** ainsi que sur les hypothèses d'un bioréacteur à écoulement piston fonctionnant en régime permanant (Equation 9). **(Voir la section VI.5 dans la partie synthèse bibliographique).**

Dans ce cas les valeurs des paramètres suivants ont été adoptées :

- Vitesse maximale de dégradation (Modèle Michaelis-Menten) : Vmax =4,504 mg/L min (UE)
- Constante de saturation (Modèle Michaelis-Menten) Ks =46,50 mg/L

- Facteur d'efficacité : $\eta = 0,8$
- Débit d'alimentation : F =100mL/h
- Taux de conversion : X = 0,99
- Concentration initiale : So= 50mg/L

D'où, à partir de l'équation (9) On obtient le volume du bioréacteur : **$V = 206\ cm^3$**

En fixant le diamètre Ø on pourra calculer la hauteur H. Pour la décoloration du NET, on a utilisé un bioréacteur à lit fixe avec les dimensions suivants : Ø=3.5 cm, H=21.5 cm. La hauteur calculée H représente la hauteur du garnissage. Le diamètre Ø représente le diamètre interne de la colonne.

X.1.2. Dispositif de bioréacteur à lit fixe

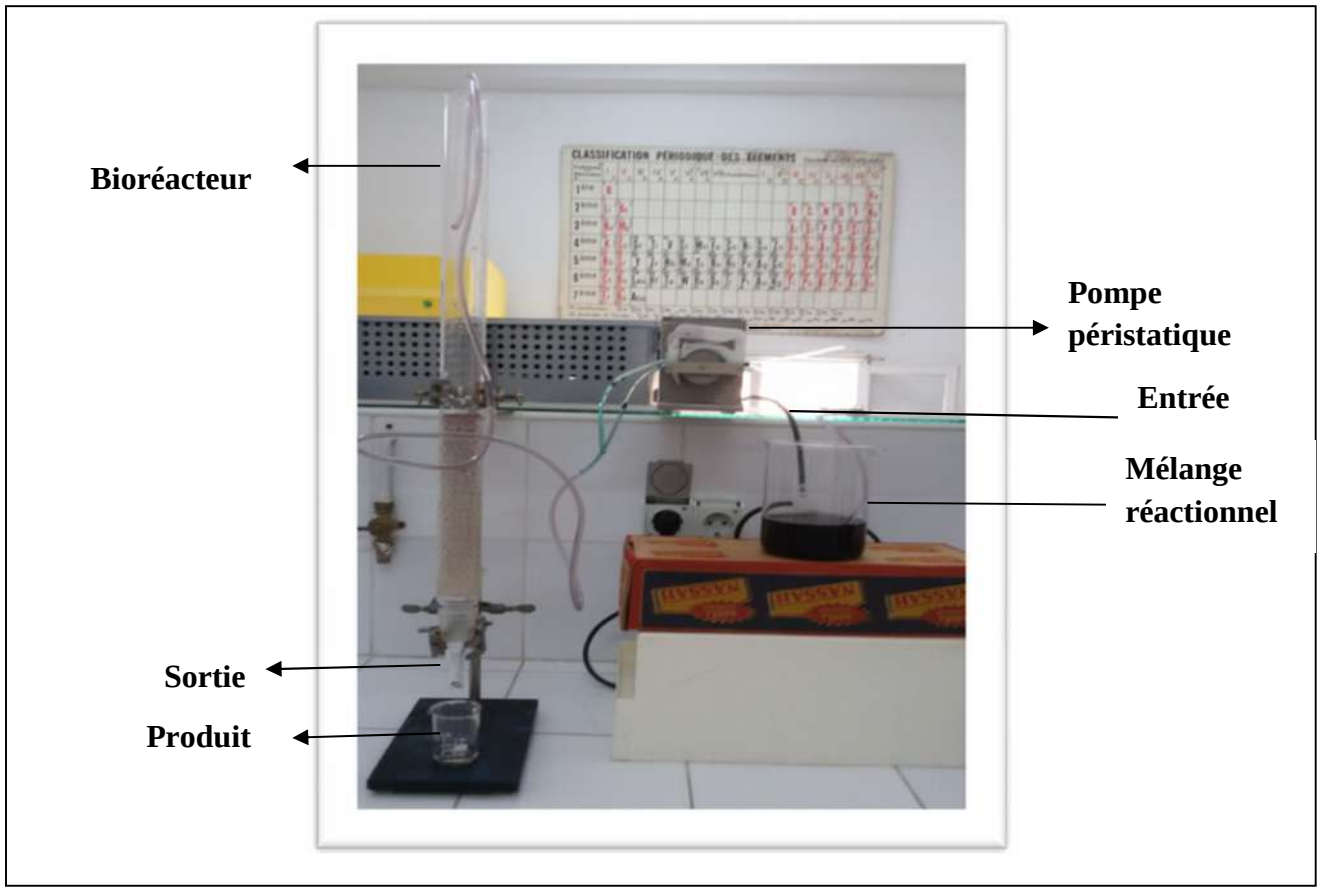


Figure X-1: Photo du bioréacteur à lit fixe. Ø=3.5 cm

X.1.3. Calcul du bioréacteur mécaniquement agité

Le bioréacteur mécaniquement agité fonctionnant en mode continu est une cuve remplie de particules sphériques contenant la peroxydase immobilisée par inclusion dans l'alginate de calcium. Le calcul du bioréacteur est basé sur les résultats de la cinétique de dégradation (en

batch) qui a été réalisée dans une précédente étude **[77].** Ainsi que les hypothèses d'un bioréacteur continu parfaitement agité en régime permanant (équation 16). **(Voir la section VI.5 dans la partie synthèse bibliographique).**

Dans ce cas les valeurs des paramètres suivants ont été adoptées :

- Constante de saturation (Modèle Michaelis-Menten) K_s= 46,50 mg/L
- Facteur d'efficacité η = 0,8
- Vitesse maximale de dégradation (Modèle Michaelis-Menten) (**VOIR ANNEXE V)**: v_{max} =31,5 mg/L min
- Activité enzymatique spécifique (**VOIR ANNEXE V)**:AE=0,28UI/Bille
- Débit d'alimentation F =100ml/h
- Taux de conversion X = 0,99
- Concentration initiale So =50mg/l
- masse de billes N = 50 g

D'où, à partir de l'équation (équation. 16), On obtient le volume du bioréacteur (volume du milieu réactionnel): **V = 306 cm^3**

- **Dispositif de bioréacteur mécaniquement agité**

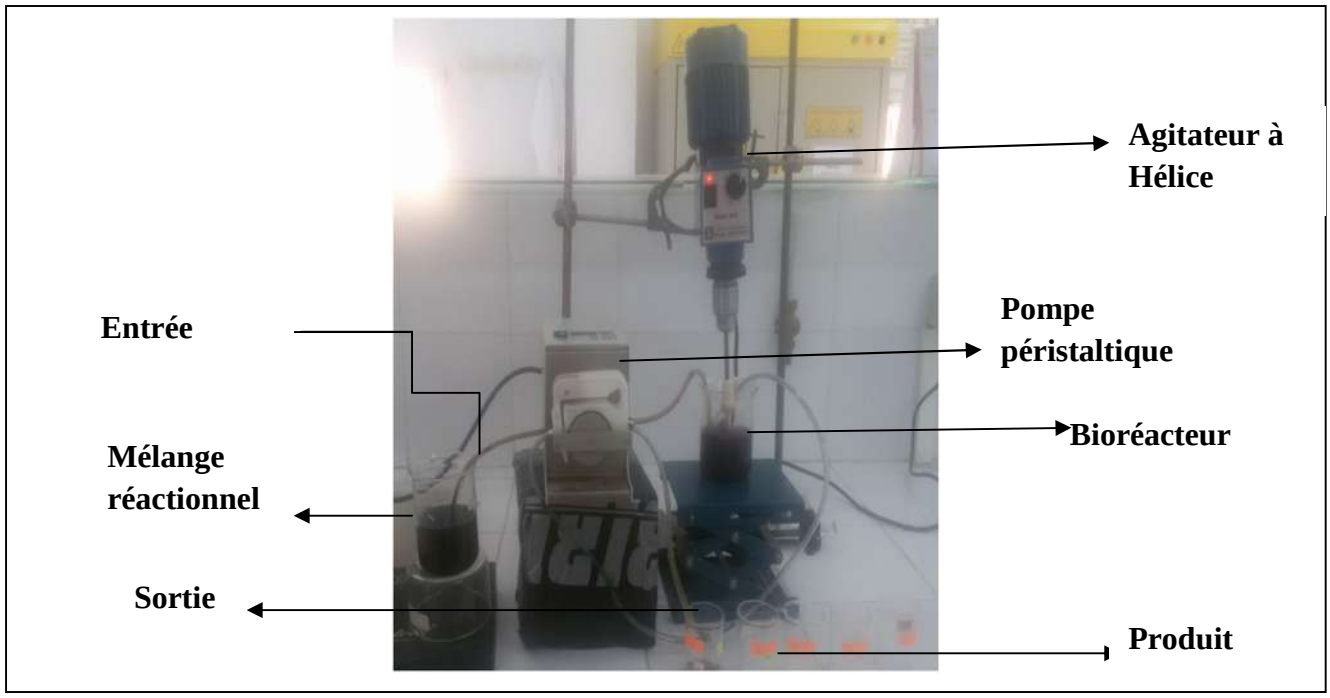


Figure X-2 : Photo du bioréacteur mécaniquement agité

XI. EFFET DES PARAMETRES OPERATOIRES SUR LA DECOLORATION DU NET DES LES BIOREACTEURS ENZYMATIQUES

Dans cette étape, on va évaluer les effets des paramètres techniques qui influencent directement sur le rendement de décoloration du NET dans le bioréacteur agité: le débit d'alimentation, la concentration du colorant et la continuité du procédé.

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 le rendement optimal. Pour étudier l'effet de ce paramètre, on se base sur le calcul de rendement déterminé par la relation suivante :

$$R(\%) = \frac{Ci - Cf}{Ci} * 100 \dots\dots\dots\dots\dots\dots\dots\dots 17$$

XI.1. Méthodes de décoloration du NET dans les bioréacteurs enzymatiques

XI.1.1. Effet de débit d'alimentation sur la décoloration du NET

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 diffusionelles 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 un bioréacteur à lit fixe puis un bioréacteur agité pour faire la comparaison. L'influence du débit d'alimentation sur le rendement de décoloration de NET dans le bioréacteur est étudié en préparant le mélange réactionnel suivant : [NET]=**50**mg/L, [H_2O_2]= **0.05M**, pH optimal= **2**.

Ce mélange sera injecté à l'aide d'une pompe péristaltique pour garder le débit constant à chaque essai, ce dernier a été varié de **100** ml/h jusqu'à **900** ml/h avec un pas de **100** ml/h. Les solutions obtenues après l'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.

XI.1.2. Effet de la concentration du 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 **500** mg/L avec un pas de **50** mg/L. Ces solutions sont pompées séparément dans les deux bioréacteurs au débit optimal. Les fractions traitées sont récupérées et centrifugées, puis analysées à l'aide d'un spectrophotomètre à **513**nm.

XI.1.3. Etude de la stabilité du bioréacteur

La durabilité des procédés est parmi les objectifs majeurs dans le développement industriel. Le fonctionnement stable pendant une longue durée est permet de rentabiliser le procédé. Pour notre cas, on soumet les deux bioréacteurs à un essai de continuité de dégradation du 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 **50** mg/L. Cette solution est pompée séparément dans les deux réacteurs avec un débit constant égal à **200** ml/h. Les fractions récupérées, ont été centrifugées puis analysées à l'aide d'un spectrophotomètre à **513** nm. L'essai est répété quotidiennement de façon continue s'étalant sur **5 heures** pendant **7 jours.**

XI.2. Résultats de décoloration du NET dans les bioréacteurs enzymatiques

A l'issu de ce travail, on va évaluer les paramètres techniques qui influencent directement le rendement de décoloration du NET dans les deux bioréacteurs: le débit d'alimentation, la concentration du colorant et la continuité du procédé.

XI.2.1. Etude de l'effet de débit d'alimentation

XI.2.1.1. Etude de l'effet de débit dans le bioréacteur à lit fixe

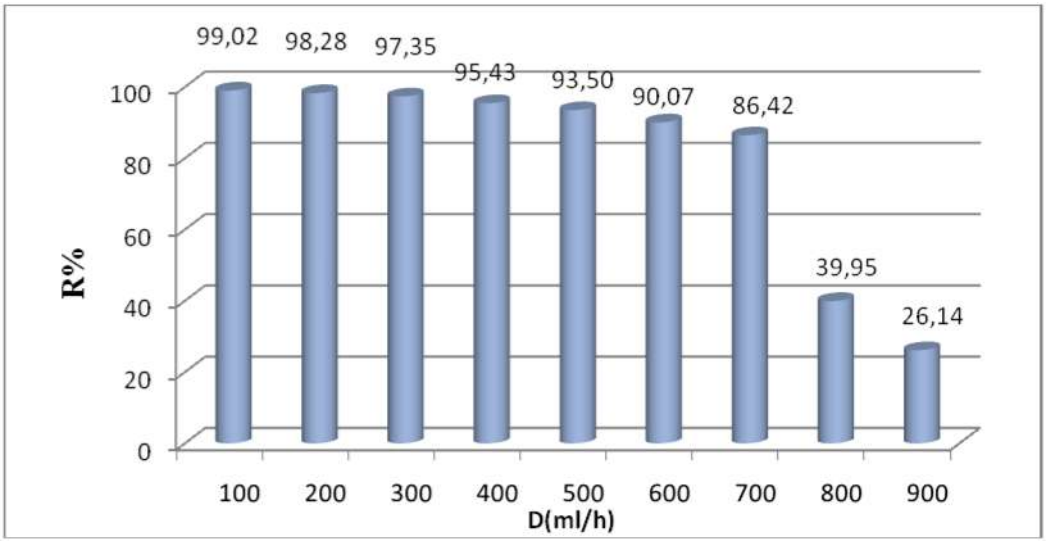


Figure XI-1: Variation de rendement et décoloration de NET en fonction du débit pour cinq fractions de 10 ml dans le bioréacteur de Ø=3.5 cm (NET=50 mg/L).

Les résultats illustrés sur la figure XI.1 montrent que le rendement de la décoloration atteint une valeur maximale égale à 99.02 % pour un débit de 100ml/h. Le rendement commence à diminuer pour des débits de 700 ml/h jusqu'à ce qu'il arrive à une valeur de 26,14 % pour un débit de 900mL/h. la diminution du rendement est due à la diminution de temps de séjour, qui est nécessaire pour faire la bioconversion de toute la quantité du colorant.

XI.2.1.2. Etude de l'effet de débit dans le bioréacteur mécaniquement agité :

Les résultats sont illustrés dans le graphe suivant :

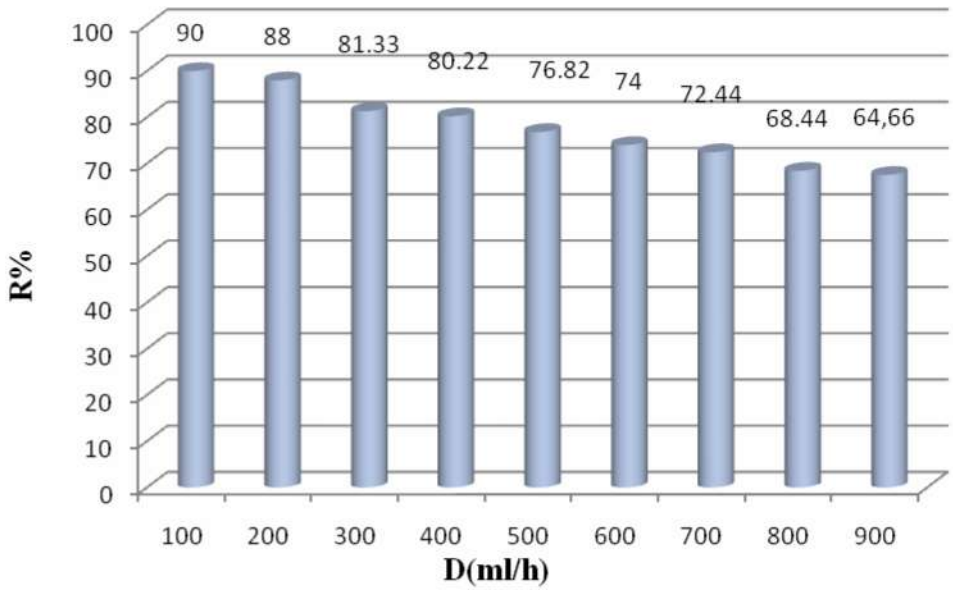


Figure XI-2 : Variation du rendement du NET en fonction du débit pour cinq fraction de 10mL dans le bioréacteur mécaniquement agité ([NET]= 50mg/L).

L'histogramme de la figure XI-2 montre que le rendement de décoloration atteint une valeur maximale égale à 90 % pour un débit de 100 ml/h. Le rendement commence à diminuer pour des débits de 500 ml/h jusqu'à ce qu'il il arrive à une valeur de 64,66% pour un débit de 900 ml/h.

XI.2.1.3. Comparaison entre les deux bioréacteurs

Pour faciliter la comparaison entre l'effet du débit sur les deux bioréacteurs, un troisième graphe a été tracé sur la figure XI-3; sur lequel on peut voir clairement la différence, et on peut interpréter de manière plus simple.

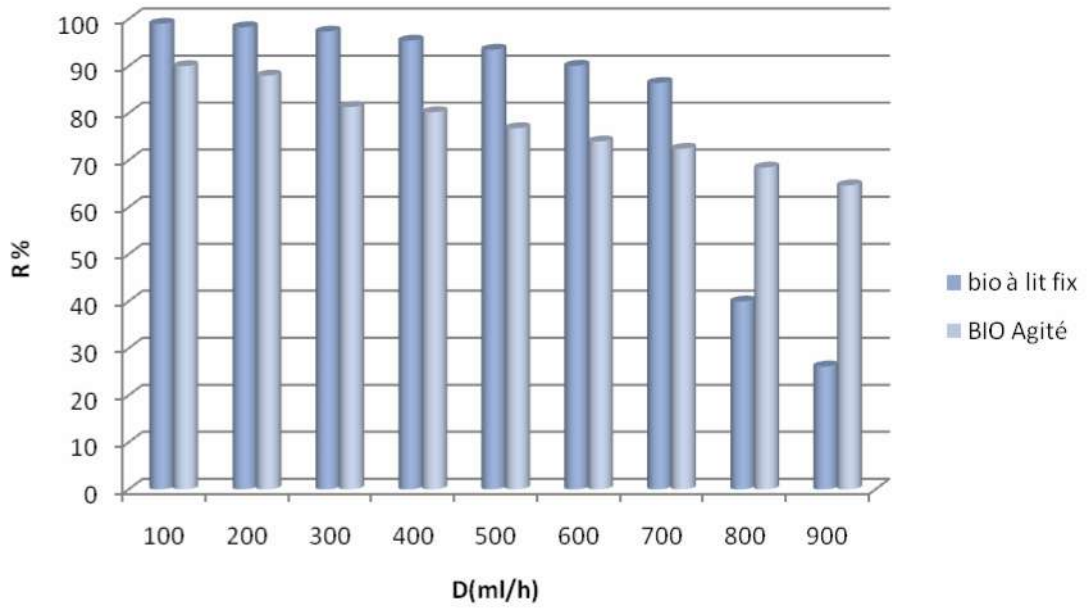


Figure XI-3: Effet de débit sur le rendement de décoloration du NET dans les deux bioréacteurs ([NET]=50mg/L).

Le rendement de décoloration de NET dans les deux bioréacteurs, à lit fixe est mécaniquement agité, sont 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 par la suite.

On peut expliquer la diminution du rendement pour les débits élevés (supérieur à 700 ml/h) aussi par l'infiltration de l'enzyme de la bille vers la solution sortante suite aux forces exercés par le débit, ce qui engendre une perte de biocatalyseur.

XI.2.2. Etude de l'effet de la concentration du colorant

XI.2.2.1. Etude de l'effet de la concentration du colorant dans le bioréacteur à lit fixe

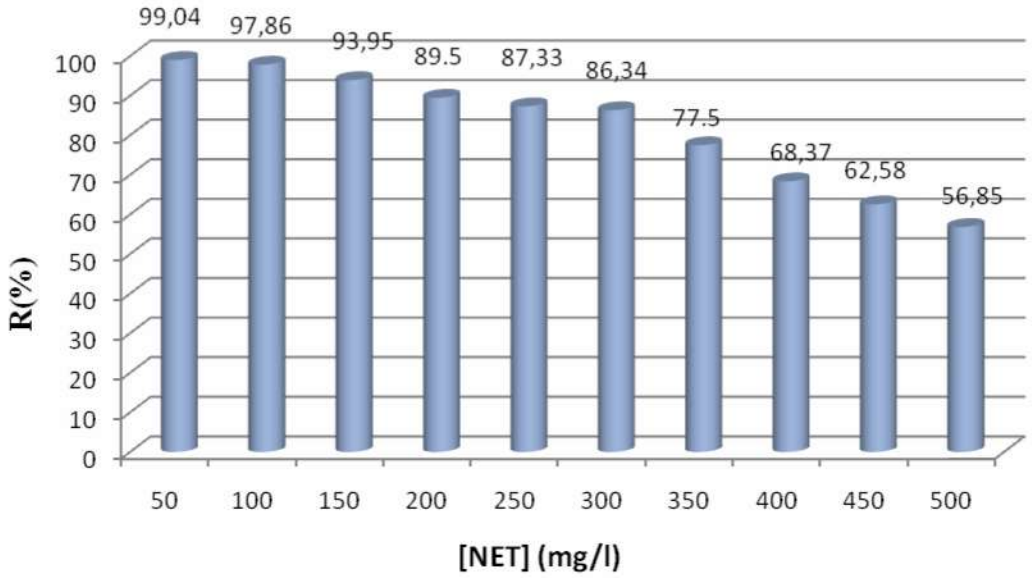


Figure XI-4: Variation du rendement de décoloration en fonction de la concentration du NET pour cinq fractions de 10 ml dans le bioréacteur de Ø=3.5 cm (D=200 ml/h).

Les résultats rapportés sur la figure XI.4 montrent que le rendement de décoloration, pour un débit de 200 ml/h, reste presque constant (95% en moyenne) pour les concentrations inferieures à 150 mg/L. La biodégradation du colorant diminue légèrement par la suite pour des concentrations variant entre 200 et 300 mg/L, pour atteindre 56,85% à une concentration de 500 mg/L.

XI.2.2.2. Etude de l'effet de la concentration du colorant dans le bioréacteur mécaniquement agité

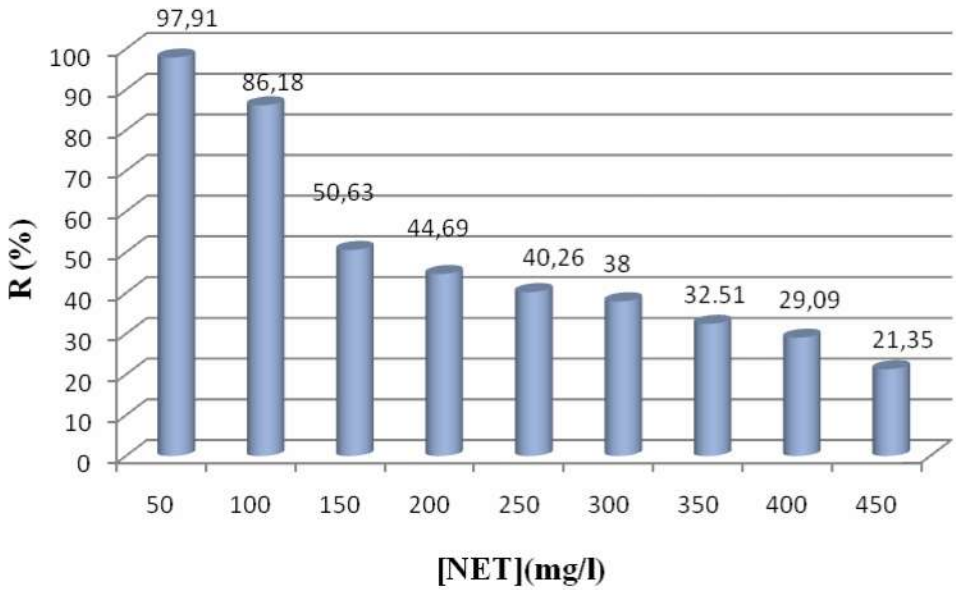


Figure XI-5: Variation de rendement de décoloration en fonction de la concentration du NET pour cinq fractions de 10 ml dans le bioréacteur mécaniquement agité (D=200mL/h).

L'histogramme de la figure XI-5 montre que le rendement de décoloration reste presque constant (97,91% à 86.18%) pour les concentrations inferieures à 100 mg/L, au-delà, la biodégradation du NET diminue brusquement jusqu'à 21,35% pour une concentration de 500mg/L.

XI.2.2.3. Comparaison entre les deux bioréacteurs

Pour récapituler les résultats obtenus dans les deux bioréacteurs, un troisième graphe a été tracé figure XI-6, qui représente les rendements calculés en fonction de différentes concentration du NET pour les deux cas d'étude.

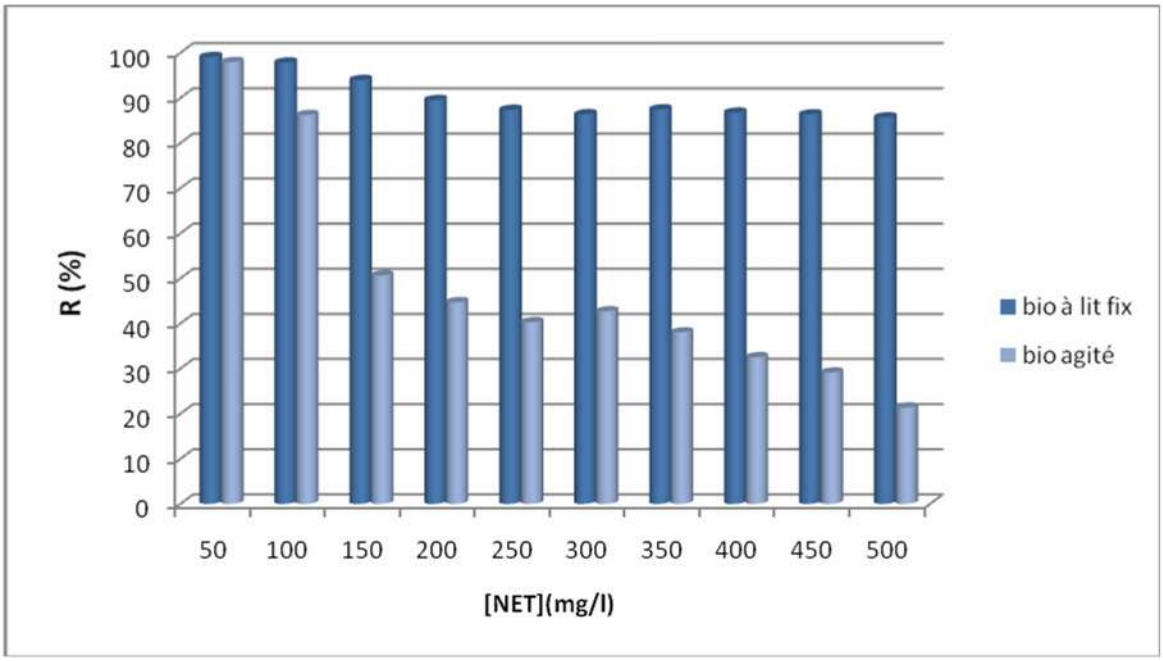


Figure XI-6 : Effet de la concentration du colorant sur le rendement de décoloration du NET dans les deux bioréacteurs à lit fixe et mécaniquement agité (D= 200 ml/h).

L'augmentation de la concentration de substrat a un effet répressif sur l'enzyme soit par saturation et encombrement stérique où par colmatage des micropores des billes, mais malgré cette contrainte, nous avons remarqué un rendement stable dans le cas de bioréacteur à lit fixe par rapport à celui agité, ça est probablement due au conception de bioréacteur qui permet une parfaite distribution du substrat sur la surface des billes dans le cas d'un lit fixe contrairement à celui agité. Ce critère donne un deuxième avantage pour les réacteurs à lit fixe.

XI.2.3. Etude la stabilité du bioréacteur

XI.2.3.1. Etude la stabilité du bioréacteur à lit fixe

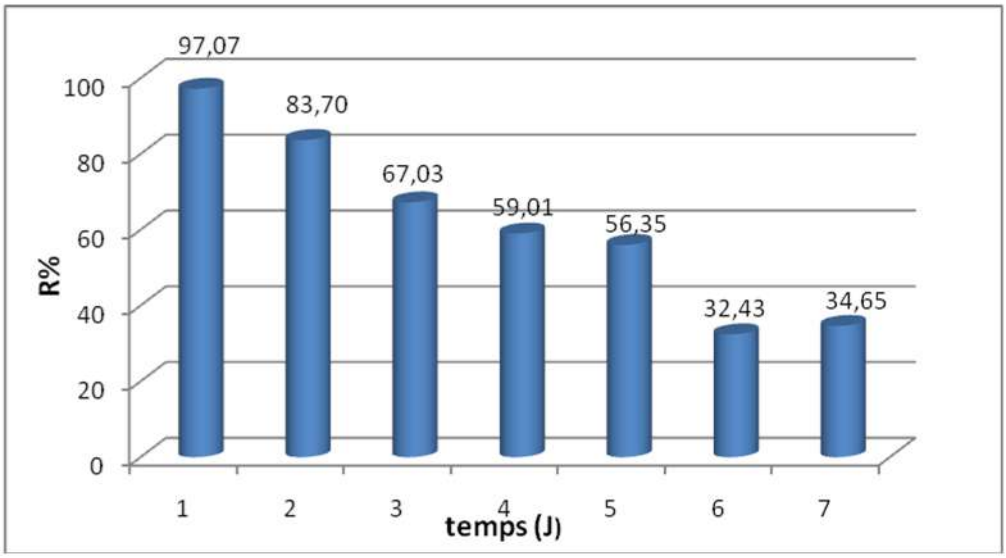


Figure XI-7 : Variation du rendement de décoloration en fonction de temps dans le bioréacteur à lit fixe (D=200mL/h, [NET]=50mg/L).

la figure XI-7 montre une diminution progressive du rendement en fonction de temps, on observe qu'après 5 jours, le rendement de décoloration reste acceptable à une valeur de 56.35%. Au-delà, le rendement chute pour atteindre une valeur de 34.65% dans le septième jour.

XI.2.3.2. Etude la stabilité du bioréacteur mécaniquement agité

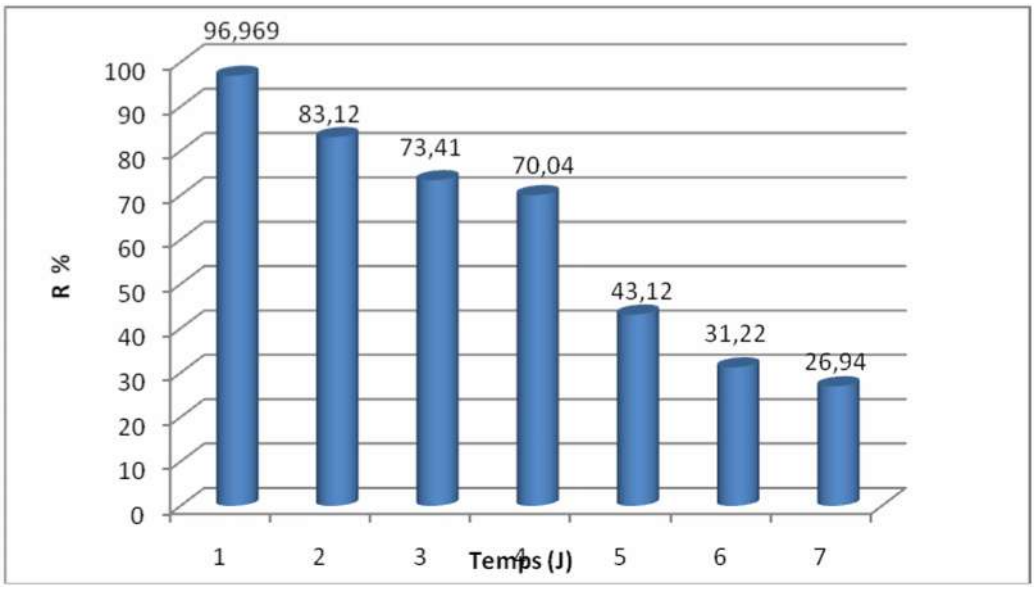


Figure XI-8: Variation du rendement de décoloration en fonction de temps dans le bioréacteur agité (D=200mL/h, [NET]=50mg/L).

Le graphe de la figure XI-8 montre que malgré la diminution progressive du rendement en fonction de temps, on observe que durant les premières quatre jours, le rendement de décoloration reste presque acceptable, une moyenne de 85% jusqu'au quatrième jour. Au-delà de cette durée, le rendement de décoloration chute brusquement.

XI.2.3.3. Comparaison entre les deux bioréacteurs

La figure XI-9 montre la différence entre les résultats obtenus en utilisant les deux types bioréacteurs

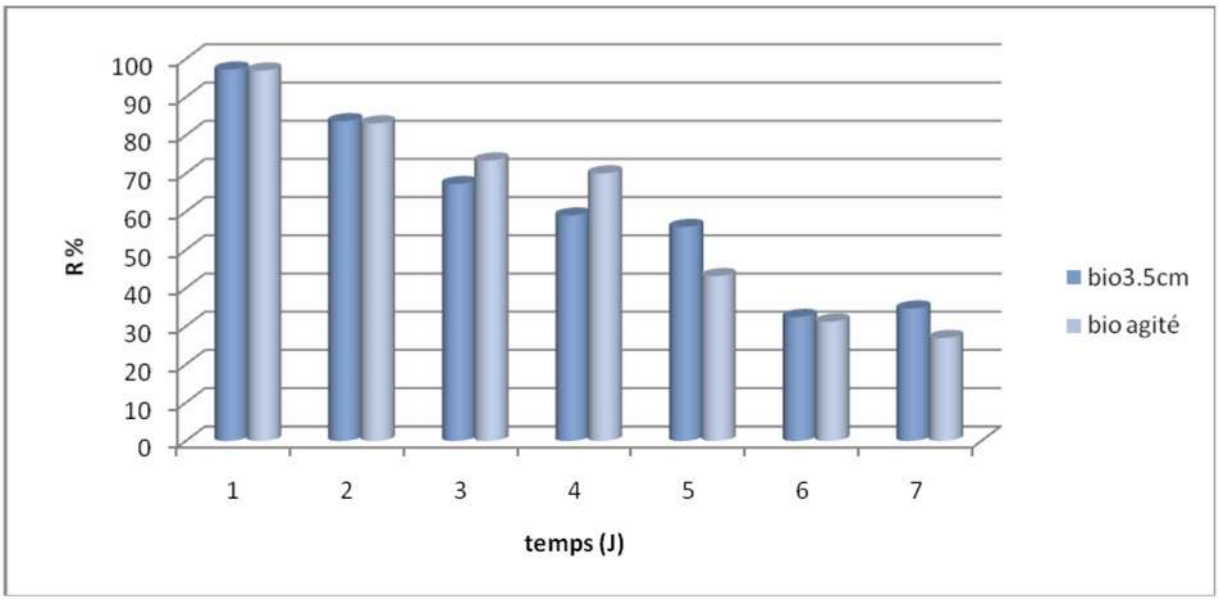


Figure XI-9 : Stabilité du conduite des deux bioréacteurs (D= 200 ml/h, [NET]=50mg/L).

La stabilité du bioréacteur au cours du temps est un facteur déterminant pour le choix de la voie de dégradation, ce facteur était moyennement satisfaisant dans notre étude, où les deux réacteurs ont gardé un rendement acceptable pendant les premières quatre jours, l'abaissement du rendement au-delà de cinquième jour est due à :

- la dénaturation de l'enzyme.
- l'accumulation des sous-produits de la dégradation dans les pores des billes d'alginate ; ce qui réduire le diamètre des pores et représente une barrière physique contre la diffusion de substrat.

Donc pour prolonger plus la durée de vie de notre bioréacteur, il est recommandé de faire des cycles de lavage par une solution tampon afin d'éliminer les sous-produits et préserver l'activité enzymatique de notre biocatalyseur.

XI.3. Simulation du fonctionnement des bioréacteurs

L'objectif est de prévoir le rendement de décoloration dans le bioréacteur sous des conditions opératoires données (débit et concentration, à partir des bilans de matière (équations 9 et 16). La comparaison sera réalisée avec les résultats expérimentaux.

a) Cas du Bioréacteur mécaniquement agité

Le rendement X sera estimé à partir de l'équation suivante :

$$\frac{X}{1-X} + (S_0/K_S)X = V_{max}\,\eta.\frac{V}{F.KS}$$

Avec :

- Vitesse maximale de dégradation (Modèle Michaelis-Menten) : v_{max} =4.5 mg/L min
- Constante de saturation (Modèle Michaelis-Menten) K_s= 46,50 mg/L
- Facteur d'efficacité η = 0,8
- Débit d'alimentation D=100ml/h
- Taux de conversion X = 0,99
- Concentration initiale So =50mg/l
- Volume de bioréacteur V=306 cm^3

En posant: $(S_0/K_S)= \alpha$; $V_{max}\,\eta.\frac{V}{F.KS} = \beta$

$\frac{x}{1-X} + \alpha\, x = \beta$

$X + \alpha\, x\,(1-X) = \beta\,(1-X)$

$X + \alpha\, x - \alpha X^2 - \beta + \beta\, X = 0$

$-\alpha X^2 + X(1+\alpha+\beta) - \beta = 0$

$\Delta = (1+\alpha+\beta)^2 - 4\,(-\alpha)\,(-\beta) = (1+\alpha+\beta)^2 - 4\alpha\,\beta$

D'où : $X = \frac{-(1+\alpha+\beta) \pm \sqrt{(1+\alpha+\beta)^2 - 4\alpha\,\beta}}{2(-\alpha)}$

Les résultats sont obtenus à partir de la résolution d'une équation de degré 2 en fonction du rendement X (Figure XI-10)

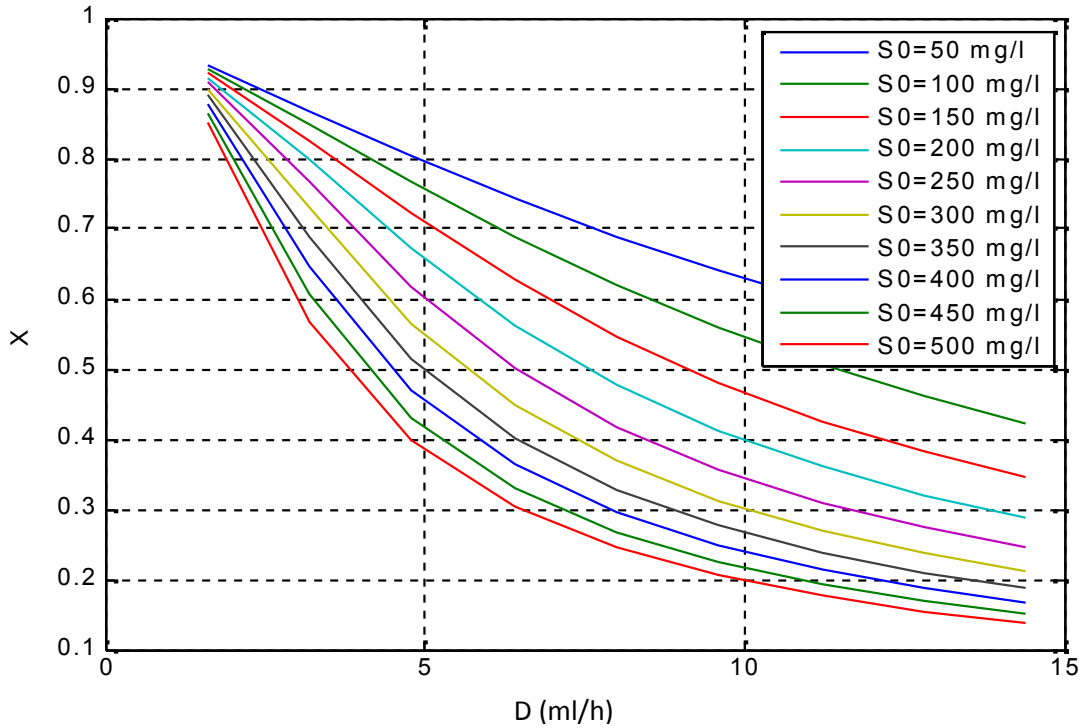


Figure XI-10: variation du taux de conversion (X) calculé dans le bioréacteur parfaitement agité en fonction du débit à différentes concentrations initiales de colorant So

Par le biais de ces deux graphes, on peut faire une comparaison avec nos résultats expérimentaux comme suite :

A titre comparatif, les résultats obtenus à la valeur de concentration initiale So = 50 mg/L sont comparés aux résultats expérimentaux pour différentes valeurs de débit (Figure XI-10) Inversement, à un débit fixé à la valeur 200 mL/h les valeurs expérimentales et calculées du rendement seront comparées pour différentes valeurs de concentrations initiales (Figure XI-11).

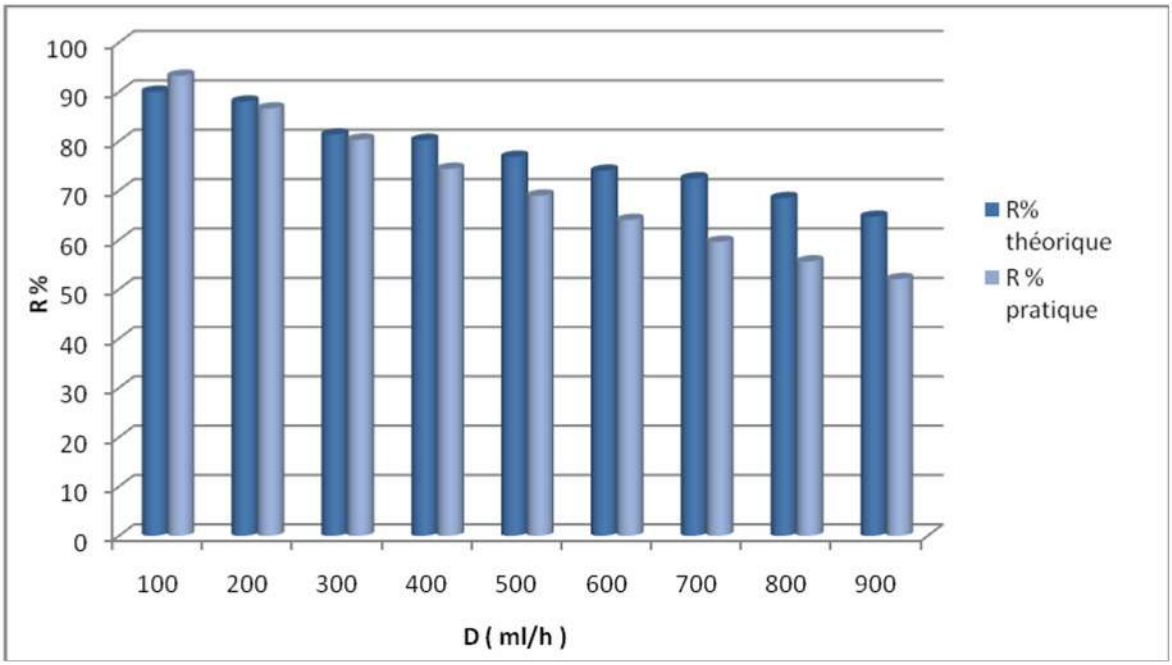


Figure XI-11 : Variation de rendement théorique et pratique en fonction de débit
Pour So= 50 mg/L

La figure IX.11 montre une concordance entre les valeurs expérimentales et calculées pour la gamme de débit 100 à 400 mL /h. Ce qui valide les hypothèses de calcul (réacteur parfaitement agité en régime permanant). Pour des valeurs de débit plus élevées, l'écart est plus important (de l'ordre de 15%).

De la même manière, à partir de la figure XI.12**,** on constate que pour des valeurs de concentration de 50 à 100 mg/L, l'écart entre les valeurs expérimentales et calculées du rendement est insignificatif. Alors que pour des valeurs plus élevées de concentration, l'écart dépasse 50%. Ceci peut être du à plusieurs raisons :

- Les limitations diffusionnelles à concentrations élevées en substrat.
- L'accumulation des produits de dégradation dans les particules d'alginate.
- L'hypothèse de mélange parfait n'est plus valable.

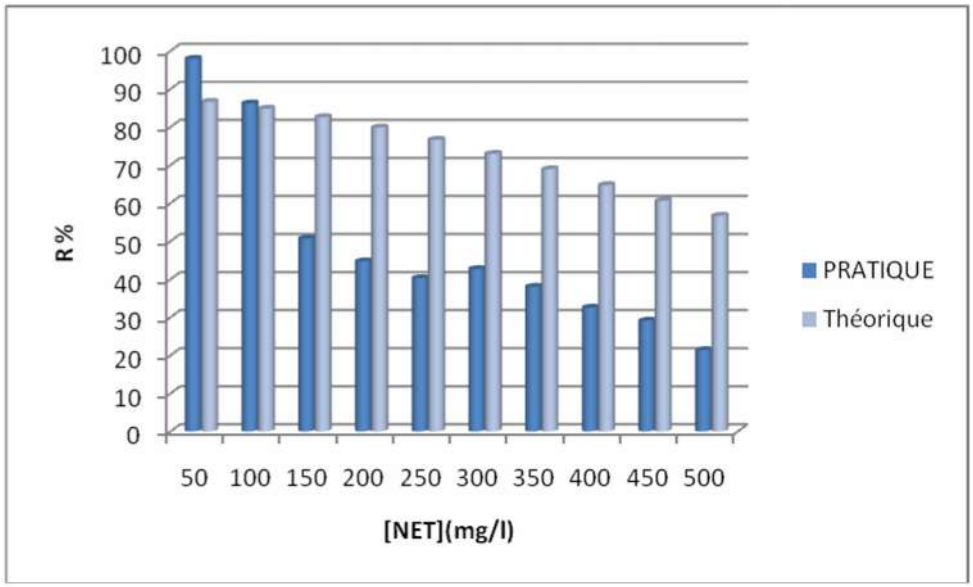


Figure XI-12 : Variation de rendement théorique et pratique en fonction de la concentration du substrat.

b) Cas du bioréacteur a lit fixe

Dans le cas du bioréacteur à lit fixe les données du rendement à différentes valeurs de concentration et de débits seront calculées à partir de l'équation (9).

On aura $$X = 1 - \exp\left[-\frac{Vmax\ (1-)V}{Ks.F}\right]$$

Les résultats sont illustrés sur la figure XI-15 :

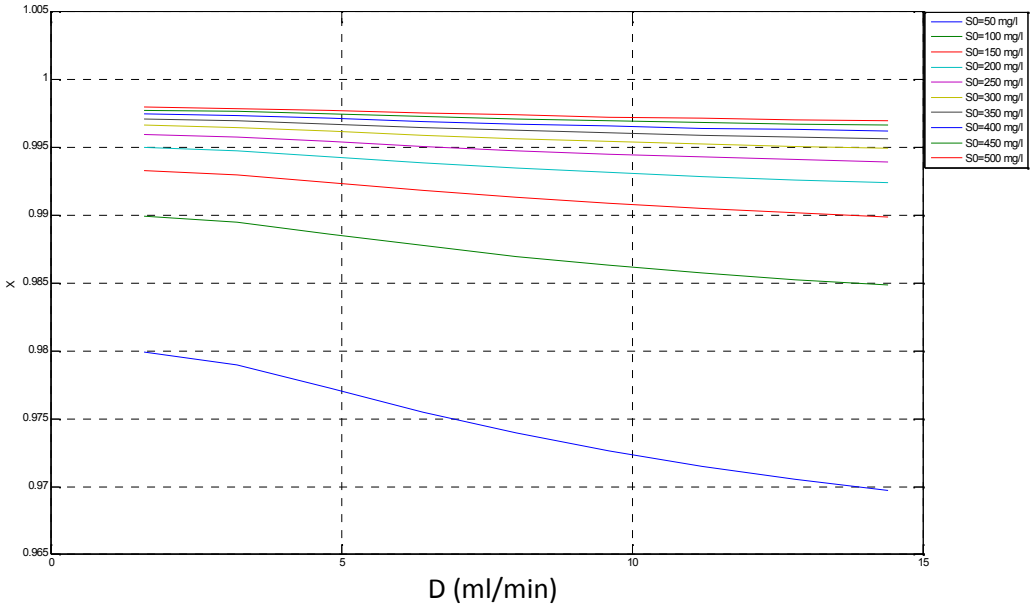


Figure XI-13: variation du taux de conversion (X) en fonction de la concentration initiale de substrat (s_0) pour différentes valeurs de débit (D)

A titre comparatif, les rendements expérimentaux et calculés sont représentés sur les figures IX.14 et IX.15 à la concentration So= 50mg/L et 200mL/h respectivement.

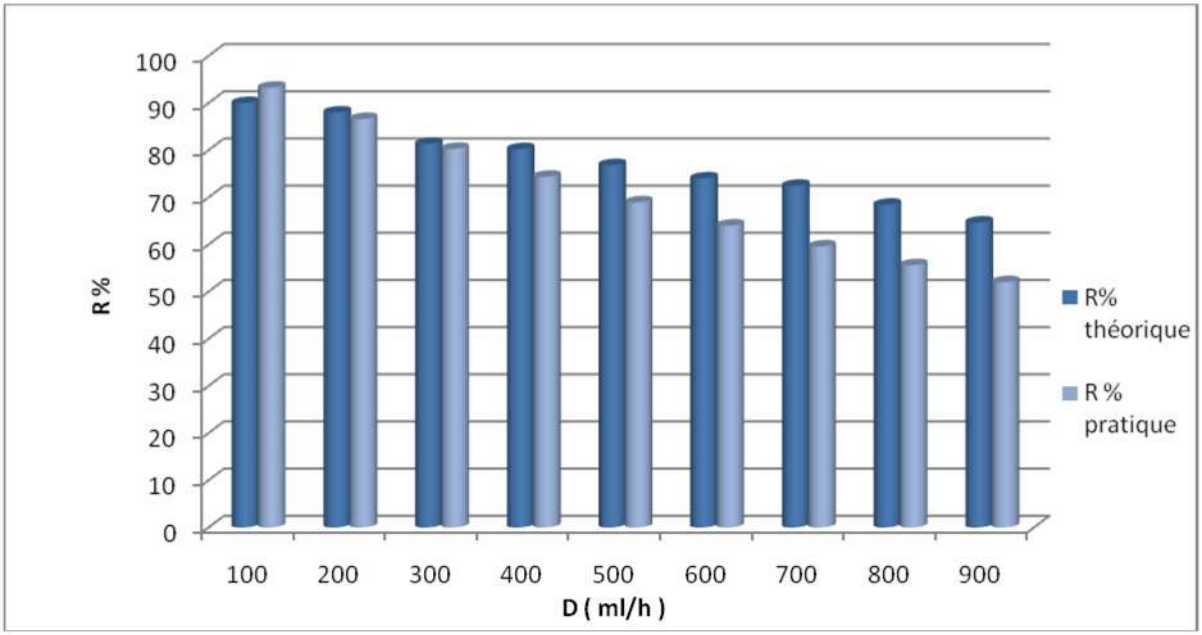


Fig. IX.14 : Variation de rendement théorique et pratique de conversion du NET en fonction de débit dans le bioréacteur à lit fixe, à la concentration So= 50 mg/L

A concentration fixée, on remarque une bonne adéquation du modèle de bioréacteur à écoulement piston pour toute la gamme de débit. L'écart ne dépasse pas 10%.

De même, pour un débit constant, le modèle décrit bien les valeurs expérimentales du fait de la conversion progressive du colorant à travers le lit et la disponibilité d'une masse importante de biocatalyseur permettant la conversion sous des conditions idéales. Par ailleurs, le régime permanant est facilement obtenu dans ce genre de bioréacteur.

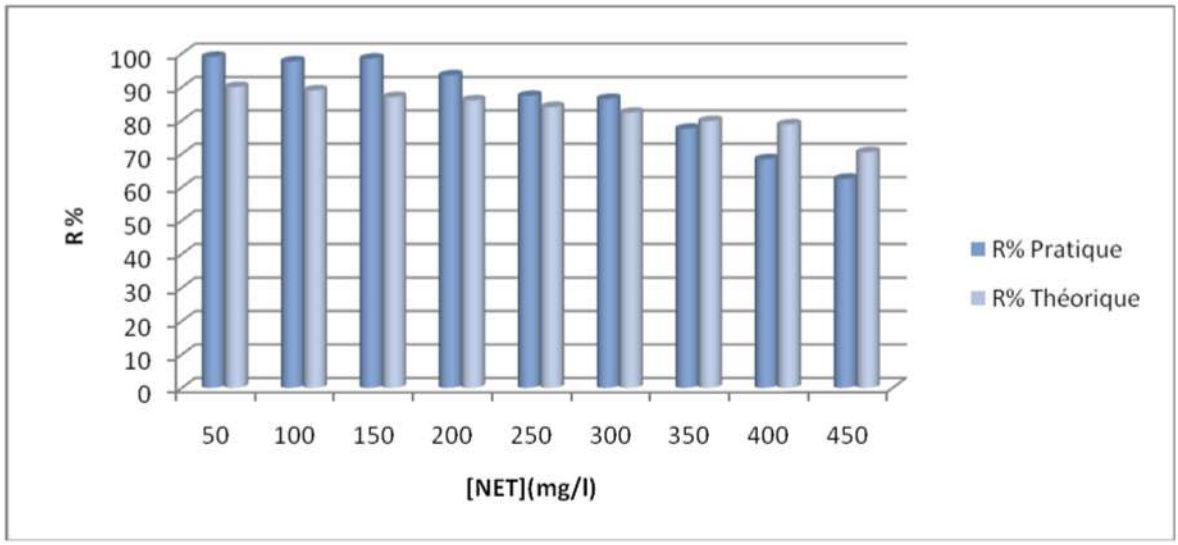


Figure IX.15 Comparaison entre rendement pratique et théorique en fonction de So pour la conversion du NET dans le bioréacteur à lit fixe (D= 200mL/h).

Conclusion générale

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 «"*Brassica Rapa*".». Notre objectif consistait à étudier la dégradation en continu d'un colorant modèle, le Noir Eriochrome (NET) en présence de la peroxydase immobilisée dans l'alginate de calcium, et dans deux types de bioréacteurs l'un à lit fixe et l'autre mécaniquement agité.

La peroxydase était obtenue à partir d'une source peu coûteuse et très disponible. La technique de purification sur l'extrait brut par la précipitation par l'acétone a été utilisée. Cette technique a permis d'obtenir un extrait partiellement purifié possédant une activité spécifique de 0.07 UI/mg et caractérisé par une concentration en protéine 4 fois plus inférieure que celle de l'extrait brut; en plus cette technique a permit de conserver l'extraits enzymatique pour une durée qui dépasse deux mois.

Le calcul du réacteur à lit fixe et du réacteur mécaniquement agité sous les conditions optimales ont été réalisés en se basant sur des données cinétiques préétablies, et des conditions idéales et optimales de fonctionnement.

Des essais ont été menés sur les deux réacteurs afin d'étudier les effets de plusieurs paramètres (débit d'alimentation, concentration en colorant et le temps de fonctionnement) sur le rendement de dégradation.

Le débit et la concentration se sont avéré des facteurs à effets significatifs sur la performance des bioréacteurs.

Le rendement maximal (97%) est obtenu dans le cas de bioréacteur de diamètre 3.5cm pour une concentration et débit d'alimentation de 50 mg/L et 200 ml/h respectivement pour une durée de fonctionnement stable de 7 jours. Dans le cas du bioréacteur mécaniquement agité, le rendement maximal (96%) pour une concentration et débit d'alimentation de 50 mg/L et 200 ml/h respectivement pour une durée de fonctionnement stable de 7 jours.

Les données de simulation ont montré que les hypothèses de calcul des bioréacteurs (idéalité de mélange, régime permanant, écoulement piston), étaient valables dans un certain domaine de fonctionnement dans le cas du bioréacteur à lit fixe.

En perspectives

Le présent travail a permis d'étudier la faisabilité à l'échelle de laboratoire, du procédé de biodégradation en continu, d'un colorant par peroxydase immobilisée, dans deux types de bioréacteurs. Il sera donc intéressent de poursuivre l'étude en traitant les points suivants :

- ✓ Etude de l'influence de la concentration enzymatique sur la performance des bioréacteurs.
- ✓ Etude approfondie des phénomènes de transfert de matière : diffusion de substrat et des produits de dégradation.
- ✓ Utilisation d'un autre type de support.
- ✓ Mise à l'échelle (scale-up) des deux types de bioréacteurs.
- ✓ Augmentation du rendement de décoloration pour des concentrations et débits très élevés soit par un recyclage de la solution ou soit par utilisation de 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).
- 10 ml solution tampon pH6
- compléter avec une Léau distillé 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 développe (Quelques minutes à une demi-heure). **(Figure A-1)**



Figure A-1: Mise en évidence de l'activité peroxydasique par le test (eau oxygénée, phénol, 4-aminoantipyrine)

Résultat



Avec l'eau **Avec le réactif**

Figure A-2: 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-Aminoantipyrine à 0.001M

• 1mL de phénol à 0.01M

On déclenche la réaction en ajoutant 0.2 ml d'extrait enzymatique aux mélanges réactionnels, on laisse les réactions pour se développer jusqu'à la stabilité (pendent 10 min). Ensuite on lit les absorbance à 517 nm. La courbe ainsi obtenue est la suivante **(Figure A-3)**:

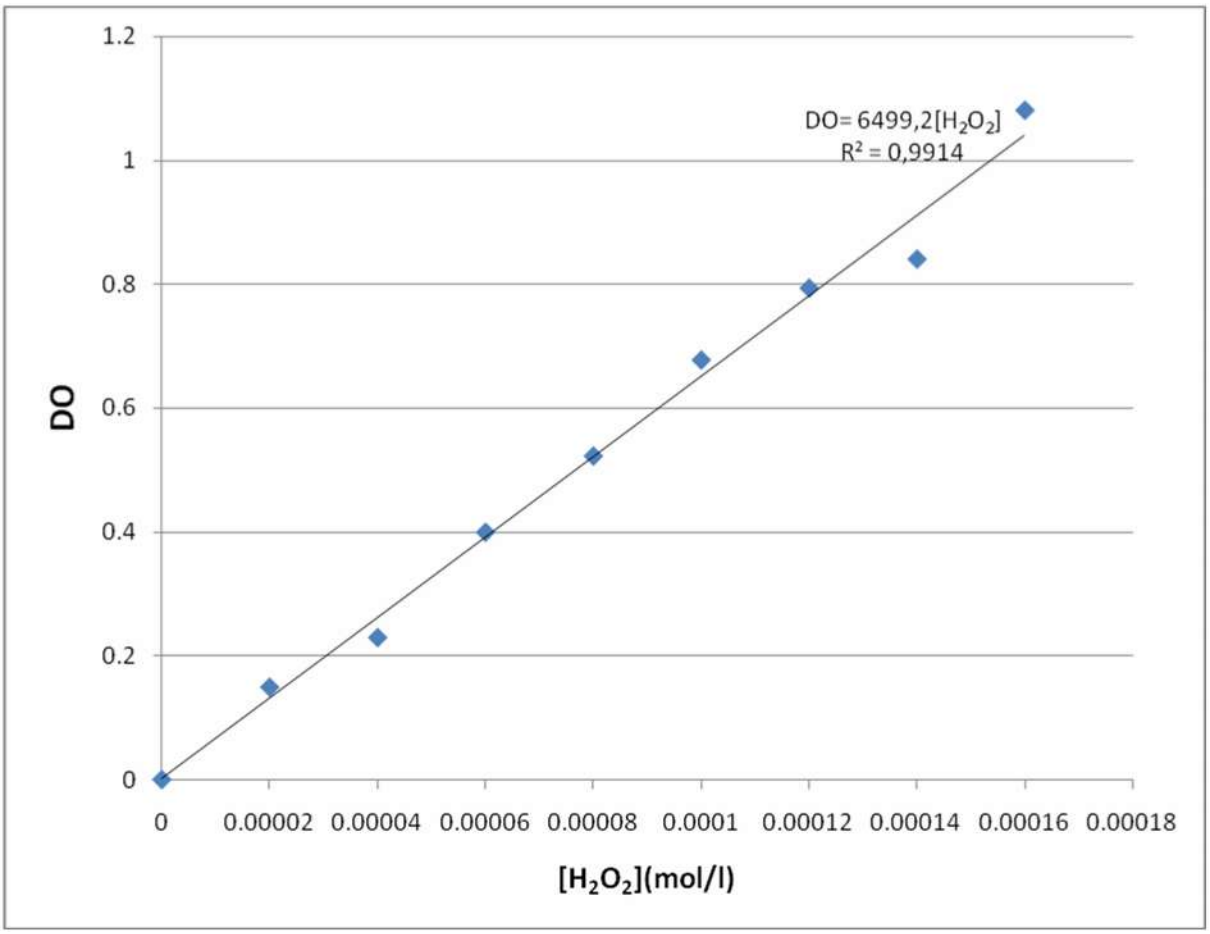


Figure A-3: Courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène.

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 Coomassie 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 (**Figure A-4) :**

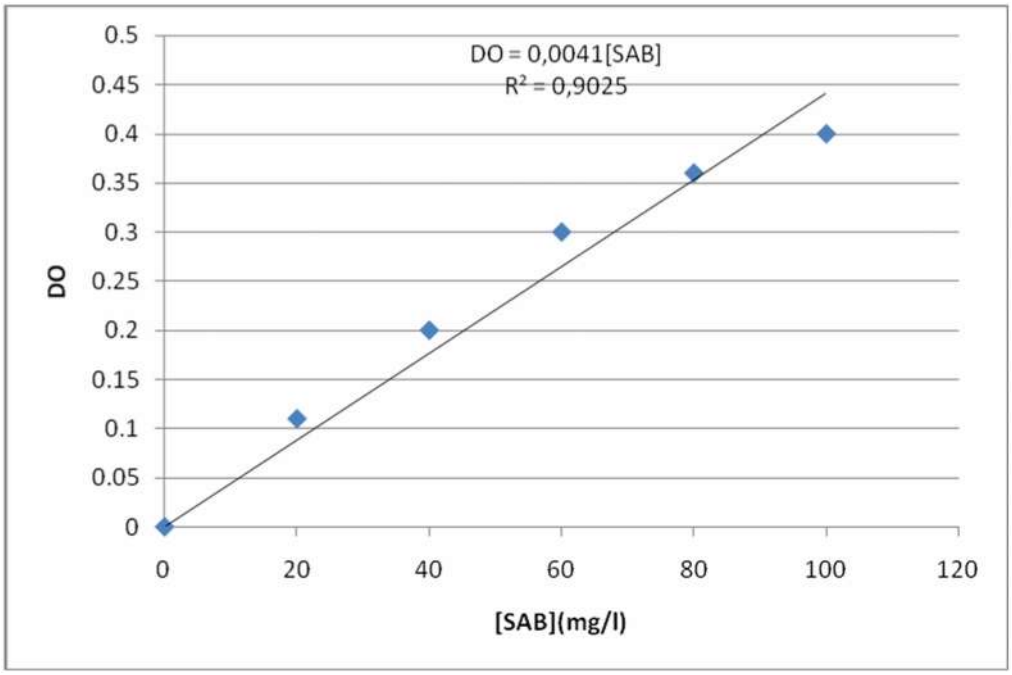


Figure A-4: Courbe d'étalonnage de la protéine SAB suivant la méthode de Bradford.

ANNEXE IV : 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 **(Figure A-5)**.

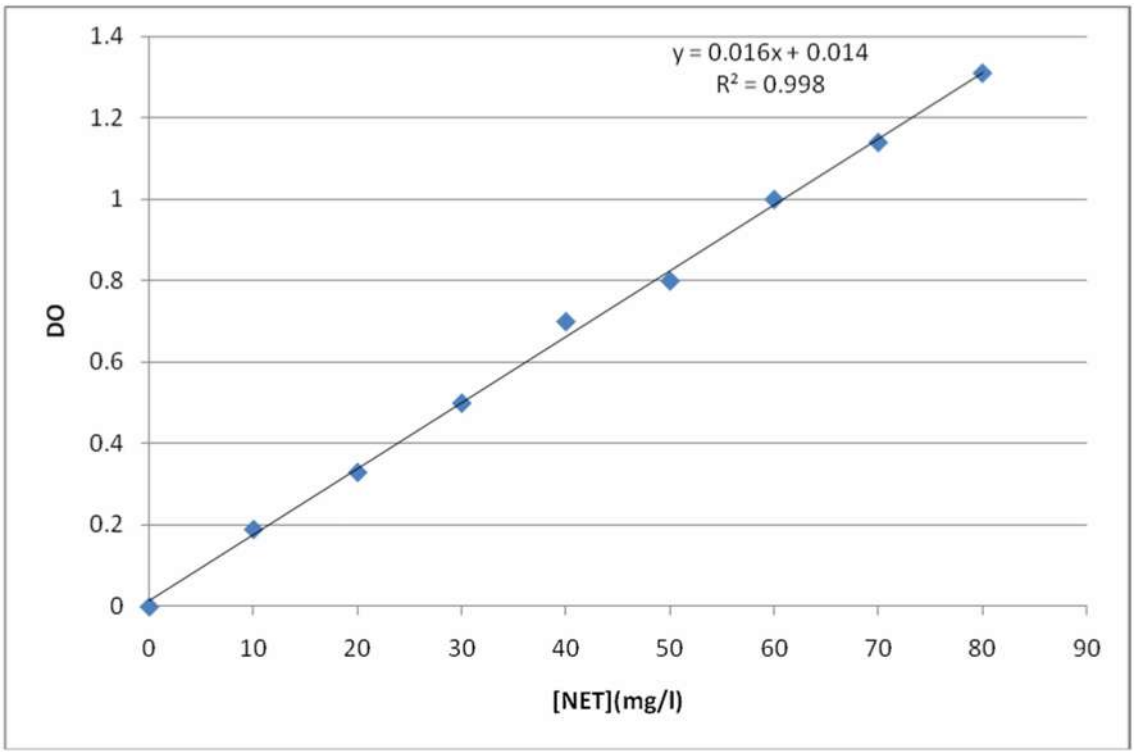


Figure A-5 : Courbe d'étalonnage du colorant NET.

ANNEXE V : CALCUL DE LA CONCENTRATION ENZYMATIQUE PAR BILLE

Le calcul de la concentration enzymatique par bille se fait par la mesure de la cinétique enzymatique de la peroxydase libre utilisée pour l'immobilisation et de la solution de $CaCl_2$ utilisé pour la gélification selon le protocole suivant :

- 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 dans le premier tube 0.2 ml de l'EEPP utilisée pour l'immobilisation à 4 ml de mélange préparé précédemment et dans le deuxième tube 0.2 ml de la solution $CaCl_2$ responsable de la gélification des billes d'alginate et on suit rapidement le développement de la couleur sous une langueur d'onde de 517 nm**.** L'intensité de la couleur est convertie en concentration en utilisant un coefficient d'extinction de.cm 6499 $mol^{-1} \cdot l \cdot cm^{-1}$ **(voir annexe II).**

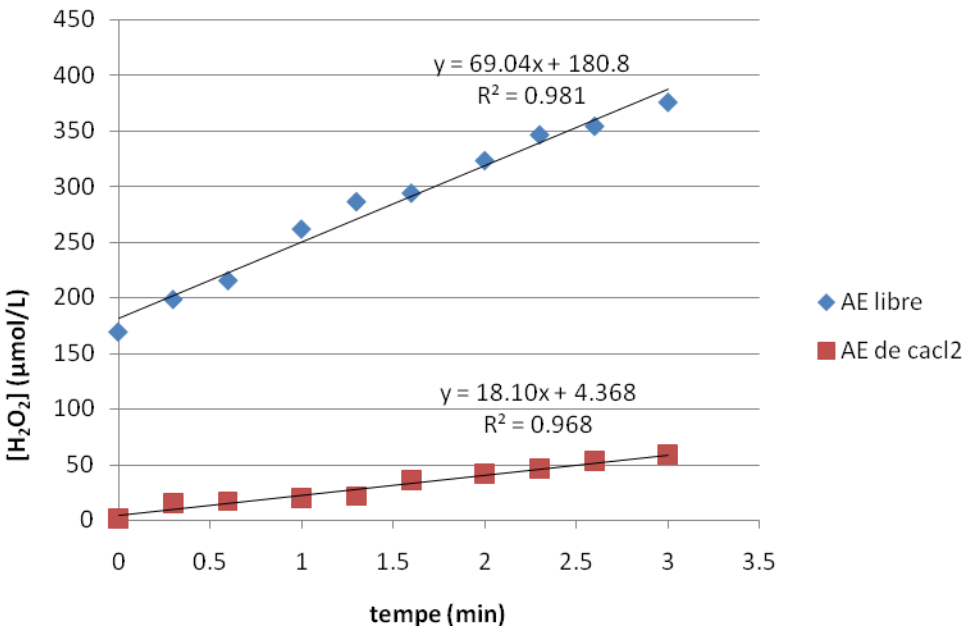


Figure A-6: Activité enzymatique de la peroxydase libre et de la solution de $CaCl_2$

La concentration d'enzyme par bille [E]= 0,28 UI/Bille

V max (E_{lire}) ⟶ 0,04UI

V max ($E_{immobile}$) ⟶ 0,28UI/Bille

V max=31,5 mg/L min

Référence bibliographiques

[1]: Nigam P., Robinson T., Mc mullan G., Marchant R., J: Bioresource Technology, **77**, 247-255, (2001).

[2]: Bauer C., Jacques P., Kalt A., J : Photochimie. Photobiologie. A: chem. 140, 87-92 (2001).

[3]: Weber J., Stickney V, C., J: Wat. Res., 27, 63, (1993).

[4]: Arslan I., Balcioglu I.., J: Chemosphere. 39, 2767-2783, (1999).

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

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

[7]: Darrajii C: thèse doctorat en sciences traitement des eaux usées industrielles: dégradation des colorants azoïques par un procédé intégré couplant un procédé d'oxydation avancée et un traitement biologique (2012).

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

[9]: Majault J : « Textiles chimiques, fibres modernes». Editions Eyrolles, 161.

[10]: Capon M., Courilleu V., Valette C : Chimie des couleurs et des odeurs, Nantes, , Culture et technique (1999).

[11]: Zhenwang L ., Zhenlu C., Jianyan L :15th World Conference on Non-Destructive Testing, 15-21 October, Rome (2000).

[12]: Zidani L : « Etude de la dégradation de quatre Colorants azoïques par Photo catalyse Comparaison avec D'autres procèdes d'oxydation Avances (poas) », thèse du Magistère, université de Batna, (2007).

[13]: Zille. A : « Laccase Réactions for Textile Applications », thèse de doctorat, université de Minho, Italie (2005).

[14]: Dore M : chimie des oxydants et traitement des eaux Edition 1989 Paris

[15]: 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).

[16]: Simont G :, guide des techniques de l'ennoblissement textiles, chapiter11, Edition industrie 1982.

[17]: Griffiths J: Developments in the light absorption properties of dyes-color and photochemical reaction .In: developments in the chemistry and technology of organic Dyes. Society of chemistry Industry, Oxford, pp 1-30 (1984)

[18]: Zollinger H: color chemistry _ syntheses, proprieties and application of organic dyes and pigments, VHS publications, New York, N.Y (1991)

[19]: Stolte M., Vieth M: acta Endosc .31(2) (2001); 125-130.

[20]: Moncada S: R .M.Palmer, E.A.Higgs, Pharmacol.Rev.43 (1991); 109-142.

[21]: Colin A: .Chimie Organique .Tome 2 édition paris(1970).

[22]: Nestmann E.R., Douglas G.R., Matula T.I , Grant C.E., Kowbel D.J :Cancer Res .39(1979).4412-4417

[23]: Rosenberg N., Rousselin X : .rhinite et asthme professionnels aux colorants réactifs .document pour le médecin de travail, vol 34,pp111-114.1988

[24]: Hedyatullah M.les colorants synthétique .4éme trimestre.1ére édition, 1976.

[25]: Vandesee F.P., Anaerobic azo dye reduction.thése de doctorat .Wageningen University .Pays-Bas (2002).

[26]: Boulal .A et Bouachema .M :« Etude cinétique de la dégradation d'un colorant par oxydation » thèse du de MASTER université de D'ORAN MOHAMED BOUDIAF

[27]: Walace T.R. : .biological Traitement of synthetic Dye Water and an industrial Textile Waste water Containing Azo Dye Compounds .Thèse Master de génie des sciences de l'environnement ,Faculté de virginie ,institut polytechnique juin (2001).

[28]: DEPA (Danish Environmental Protection Agency), Survey of azo-colorants in Denmark, Toxicity and fate of azo dyes, (2000).

[29]: C. Bauer, P. Jacques, A. Kalt, J. Photochem. Photobiol. A: chem. 140, 87-92. (2001)

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

[31]: Christie R., M: Color chemistry: The royal society of chemistry, Thomas Graham House,

[32]: Harrlekas F: « Couplage des procédés membranaires aux techniques chimiques ou biologiques pour le traitement des rejets liquides de l'industrie textile », thèse de doctorat, université KADI Ayyad, Maroc (2008).

[33]: Tandjaoui N: Contribution à l'étude de l'élimination des colorants textiles par voie enzymatique thèse de master université yahia farés de Médéa 2011

[34]: Aliouche S: « étude de l'élimination d'un colorant par différentes méthodes photochimiques en milieu aqueux », thèse du magistère, université Mentouri, Constantine (2007).

[35]: **Hamani S.** « Étude de dégradation des colorants de textile par les procédés d'oxydation avancée. Application à la dépollution des rejets industriels », thèse de doctorat, université Tunis El Manar, (2008)

[36]: 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).

[37]: Ben Mansour H., Boughzala O., Dridi d., Barillier D., Chekir-Ghedira L et Mosrati R : les colorants textiles sources de contamination de l'eau,(2007).p.209-238.

[38]:Crini.G, Badot P-M: « Traitement et épuration des eaux industrielles polluées: Procédés membranaires, bio adsorption et oxydation chimique »Presse Universitaire de French Comité, (2007).

[39]: 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).

[40] :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).

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

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

[43]: 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).

[44]: Frénot M., Vierling É : « Biochimie des aliments: diététique du sujet bien portant » centre régionale de documentation pédagogique d'Aquitaine, (2001).

[45]: Augere B : « les enzymes biocatalyseurs protéiques » Ellipses édition Marketing S.A. (2001).

[46]: Weinman S., Méhul P « toute la biochimie » Dunod, Paris ,2004

[47]: Garrett. RH, Grisham.CM "Biochimie", DE Boeck Université s.é. 2000

[48]: Moussard.Ch « Biochimie structurale et métabolique: Médecine, Pharmacie, Sciences ». Edition de Boeck et Lancier s.é., (2002).

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

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

[51] : Vaubourdolle M : « Toxicologie, sciences mathématiques, physiques et Chimiques » Edition Walters Kluwer SA, (2007).

[52]: Bisswanger H « Practical enzymology » WILEY-VCH Verlag GmbH et CoKGaA, Weinheim, (2004).

[53] : Audigié C., Zonszain.,F « Biochimie métabolique » Doin édition, groupe Liaison S.A(1995).

[54] :Turner A. P. F., Karube I., Wilson G.S, Worsfold P. J: Analytical Chemical Acta **201** (1987) 363

[55]: **Yang M.C, Lin C:** Biomaterials **22** (2001) 891

[56] : Eser A. E, Murat E. Y : biotechnologie **28** (2000) 95.

[57]: Splittgerber G.A: Chemical Education 62 Issue **11** (1985) 1008.

[58]: Atkins w.p: Physical Chemistry. 3rd Ed Oxford University, Press New York (1982).

[59]: Guisan J.M:« Immobilization of enzymes and cells» Humana Press Inc. 999 Riverview Drive, suite 208 Totawa, New Jersey 07512, (2006).

[60]: Baaziz M., Qacif N., Bendiab K., Aoud A : « Les peroxydases des plantes, Aspect Théorique et application pratique »Congré international de biochimie, Agadir(2006).

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

[62]: Biotechnology Annual Review, Volume 9 public par M.R. El-Gewely.

[63]: Kandelbauer.A, Guebitz.G.M "Bioremediation for the Décolourization of Textile Dyes ". Journal of Environmental Sciences, 26**,**270-288, (2009).

[64]: Dias A., Sampaio A., Bezerra R.M :"Environmental Applications of Fungal and Plant Systems: Décolourization of Textile Wastewater and Related Dyestuffs", University of Trásos- Montes e Alto Douro, **19**, 446-463, Portugal (2007).

[65] : **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).

[66] : **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).

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

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

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

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

[71]: **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)

[72]: Engasser, j. m.: factors influencing the performance of enzymatic reactors. In enzyme and enzyme catalysis, Ellis Horwood., 174-202 (1980).

[73]: Fluka, chemika–biochimika Analytika; Suitzerland; 1995/1996

[74]: Produit chimique et reactifs, VWR international Merck; 2002.

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

[76]: Ghaemmaghami, F.I. Alemzadeh, S. Motamed "Seed Coat Soybean Peroxidase: Extraction and Biocatalytic Properties Determination" Iranian Journal of Chemical Engineering **7**, 28-38, (2010).

[77]: Abed K., Chemam A: ttraitement enzymatique des colorant azoiques dans un réacteur à peroxydase immobilisée. Thèse de master, université de Médéa (2014).