République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique

Université Dr. Yahia FARES de Médéa

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

Mémoire de projet de fin d'Etudes

Pour l'Obtention du Diplôme de Master en Génie des Procédés

Option Bioprocédés Pharmaceutiques

Thème :

Etude de décoloration des colorants : jaune direct et bleu disperse par procédés enzymatique et chimique.

Proposé et dirigé par :

- Dr.M. ABOUSEOUD
- Mme.N.BOUCHERIT

Présenté par :

-DAOUDI Habiba

-BAIZID Fatiha

Promotion: 2012-2013

REMERCIEMENTS :

Toutes nos gratitudes, grâce et remerciement au bon dieu qui nous a dirigé dans la voie de la science, et nous a la donné le courage et la volonté pour arriver à ce niveau.

Nous tenons tout d'abord à remercier fortement notre promoteur Mme .BOUCHRIT.N et Dr.ABOUSEOUD.M, qui nous ont aidé et donné tout leur temps pour compléter notre travail. Nous les remercions pour leur compréhension, leurs conseils précieux.

Tous nos remerciements également à nos familles pour l'aide inconditionnel durant cette période.

Enfin, Nous remercions sincèrement tous nos amis de pris ou de loin, et tous ceux qui nous a aidé, d'une manière ou d'une autre durant toute la période de recherche de ce mémoire

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers Parents, dont le sacrifice, la tendresse, l'amour, la patience, le soutien, L'aide et les encouragements sont l'essence de ma réussite.

Mes frères et sœurs :

Abla,Khadidja,Djaouhar,Malek,Mohamed,Abd el hadi

Cher mari de ma sœur : kamel

Mes cousines :Fouzia,Wahiba,Madiha

A tous les membres de ma famille qui m'ont aidé et m'ont courage afin que je réalise ce projet

Sans oubliers ma binôme :Fatiha

Également à ma promotrice Mme.BOUCHERIT qui m'a appris tous les savoirs durant ma formation pratique

à mes copines en particulier :farida ,meriem,karima,amina ,hadjira, souad,habiba et tout que je connu.

Sommaire

INTRODUCTION……..1

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : Généralités sur Les enzymes, les peroxydases et l'immobilisation des enzymes.

I.1. Généralités sur les enzymes……4

I.1.1. Classification et nomenclature……...4

I.1.2. Catalyse enzymatique……..5

I.2. Les peroxydases ……...7

I.2.1. Définition……7

I.2.2. Classification ……7

I.2.3. Cycle catalytique de la peroxydase……8

I.2.4. Applications industrielles de la peroxydase……9

I.3. Immobilisation des enzymes ……12

I.3.1. Propriété des enzymes immobilisées……12

I.3.2. Méthodes d'immobilisation……..13

I.3.2.1. Immobilisation par inclusion……..13

I.3.2.2. Immobilisation par liaison……14

1. Liaison à un support……14

2. Réticulation……15

3. Immobilisation par inclusion dans l'alginate ……15

I.3.3. Intérêts d'immobilisation……17

I.3.4. Applications des enzymes immobilisées……17

I.3.5. Applications des peroxydases immobilisées dans le traitement des colorants……18

Chapitre II : Colorants textiles, méthodes de traitement et couplage des procédés

II.1. Généralités sur les colorants textiles……...20

II.2. Classification des colorants ……20

II.2.1. Les colorants azoïques ……20

II.2.2. Les colorants anthraquinoniques……21

II.2.3. Les colorants indigoïdes……21

II.2.4. Les colorants xanthène……21
II.2.5. Les phtalocyanines……..21
II.2.6. Les colorants nitrosés ……22
II.2.7. Les colorants triphénylméthanes……22
II.3. Fixation des colorants aux fibres ……23
II.4. Synthèse et réactivité des colorants azoïques et anthraquinoniques……....24
II.5. Rejets d'effluents textiles……26
II.5.1. Propriétés……26
II.5.2. Toxicité des colorants textiles…….27
II.6. procédés de traitement des colorants ……....28
II.6.1. Méthodes classiques……..29
II.6.1.1. Méthodes physiques ……..29
A-Adsorption……..29
B-Filtration membranaire……30
C-Coagulation/floculation……..30
II.6.1.2.Méthodes biologiques…….....30
A. Bactéries ……30
B-Fongis……31
C-Algues…….31
II .6.1.3. Méthodes chimiques…….32
II.6.2. Méthodes alternatives……...32
II.6.2.1. Méthodes d'oxydation avancée……32
A.Procédés photochimiques…… ..33
♦.1. Photolyse d'O3 ……33
♦.2. Photolyse de H_2O_2,……...33
♦.3. Photo-peroxonation $O_3/UV/H_2O_2$,……33
B-Procédés photocatalytiques……...33
♦.1. Photo-Fenton $Fe^{2+}/H_2O_2/UV$……34
♦.2. Photocatalyse avec TiO_2……...34
C-Procédés d'oxydation chimique…….....34
♦.1. Peroxonation (O_3/H_2O_2)……..34
♦.2. Procédé Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2), ……..35
D-Procédés électrochimiques……...36

♦.1. Electrochimie directe ou Oxydation anodique……36
♦.2. Electrochimie indirecte ou électro-Fenton,……..36
II.6.2.2. Méthodes enzymatiques…….37
♦.1.Laccases,……38
♦.2. Peroxydases……..38
II.6.2.3. Couplage des procédés…….….39

PARTIE EXPRIMENTALE

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.1. Critères de choix…….41
III.1.1.Choix des colorants…….41
III.1.2.Choix de la source végétale…….41
III.2. Matériels et réactifs utilisés……42
III.2.1.Equipement utilisés……42
III.2.2. Réactifs utilisés ……42
III.2.3.Caractéristiques des substrats utilisés…….....43
III. 3. Méthodes…….....44
III.3.1.Extraction et purification de la peroxydase……44
III.3.1.1. Extraction de la peroxydase de la courgette…….44
III.3.1.2.Purification de la peroxydase par acétone……..…45
III.3.2. Caractérisation de la peroxydase……..46
III.3.2.1. Mesure de l'activité peroxydasique…….46
III.3.2.2. Dosage de la quantité des protéines …….47
III.4.Préparation et étalonnage des colorants…….48
III.5. Etude de décoloration de JD106 et BD 77 par peroxydase immobilisée…….48
III.5.1. Immobilisation de la peroxydase dans les billes d'alginates……..48
III.5.2. Essais d'optimisation des paramètres de décoloration des colorants JD 106, BD 77 par peroxydase immobilisée……..50
a/ Effet de pH …….50
b/ Effet de Temps de Contact ……50
c- Principe de la méthode des plans d'expérience utilisée……..50
d- Optimisation des concentrations des substrats et de peroxydase……51
III.5.3.Batch successifs……...54
III.6. Etude de décoloration des colorants JD106 et BD77 par le procédé Fenton……54

a/ Effet de PH……..54
b / Effet de Temps de Contact…….55
c/ Optimisation des concentrations de colorant, de H_2O_2 et de F^{2+} par plans d'experiences…….55
III.6. Etude du procédé de couplage : peroxydase immobilisée-fenton……57

Chapitre IV : Résultats et Discussions

IV.RESULTATS ET DISCUSIONS……...59
IV.1.purification et dosage des activites enzymatique…….59
IV.1.1.Effet de la méthode de purification sur l'activité catalytique de la peroxydase……59
IV.2.Etude de la a décoloration de JD106 et BD 77 par la peroxydase immobilisée....60
IV.2.1.Caractérisation des billes de peroxydase ……60
IV.2.2.Détermination de l'activité enzymatique des billes……60
IV.2.3. Essais d'optimisation des paramètres……60
a/ Effet de PH……..60
b/ Effet de Temps de Contact…….61
c/ Essais d'optimisation des autres paramètres par plan d'expérience……62
d / Elaboration du modèle……69
IV.2.4.Batch successifs…….70
IV.3. Etude de décoloration des colorants JD106 et BD77 par le procédé Fenton…....71
a/ Effet de pH. ……..…71
b /Effet de Temps de Contact……..…..72
c/Optimisation des concentrations de colorant, de peroxydase et de catalyseur par le procédé Fenton, en utilisant les plans d'expériences……..73
d/Elaboration du modèle…….80
IV.4. Etude du procédé de couplage : peroxydase immobilisée-fenton……..81
a/ Elaboration du modèle……84
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE…….86

Références bibliographiques

Annexe

Liste des figures

Fig.I.1. Diagramme énergétique d'une réaction chimique catalysée par une enzyme. Effet de diminution de réduction de l'énergie d'activation sur le nombre de molécules convertis……5

Fig.I.2. Ferriprotoporphyrine IX ou hème b. (A, B, C, D) représentent les quatre noyaux pyrroles ……7

Fig. I.3. Cycle catalytique de la partie Hémine de la peroxydase……...9

Fig. I.4 : Immobilisation par inclusion……...13

Fig. I.5. Les deux modes de fixation non covalente à un support……14

Fig.I.6. Liaison covalente entre l'enzyme et le support……15

Fig.I.7. Réticulation des enzymes ……..15

Fig. I.8. Structure de l'alginate……16

Fig .II.1. Le groupement fonctionnel azo des colorant azoïques……20

Fig .II.2. La structure moléculaire d'un colorant antraquinonique……21

Fig.II.3. La structure moléculaire des colorants indigoïdes……21

Fig.II.4. La structure moléculaire des colorants xanthène ……21

Fig.II.5. Structure moléculaire d'un colorant phtalocyanines……22

Fig.II.6. Structure moléculaire d'un colorant nitrosés……22

Fig.II.7. Structure moléculaire d'un colorant triphénylméthane……22

Fig.II.8. Synthèse des colorants azoïques……24

Fig.II.9. La réduction libre des amines aromatiques primaires incolores……24

Fig.II.10 : Mécanisme proposée pour l'oxydation d'un colorant azoïque par peroxydase……25

Fig.II.11. Synthèse d'un noyau anthraquinonique……25

Fig.II. 12. Mécanisme de synthèse d'un colorants anthraquinonique disubstitué 1-4…...25

Fig.II.13. Structures chimiques de quelques amines aromatiques toxiques……28

Fig.II.14. Principaux procédés de production des $OH^{\bullet}$……..33

Fig.II.15. Les OH* additionnent aux cycles aromatiques et hétérocycliques……35

Fig.III.1 . Protocole d'extraction de la peroxydase……44

Fig.III.2 .Protocole de purification de la peroxydase……45

Fig.III.3. la réaction entre le phénol et la peroxyde d'hydrogène en présence de 4-Amino-antipyrine……..46

Fig.III.4. Protocole d'immobilisation de la peroxydase de la courgette……49

Fig. IV.1. Aspect des deux extraits……59

Fig.IV.2. Effet de pH sur le rendement de décoloration de JD 106 et BD 77 par La peroxydase immobilisée……60
Fig.IV.3. : Cinétique de décoloration : (A) JD 106, (B) DB77, par peroxydase immobilisée……61
Fig. IV.4. Effets moyens pour JD106…… 64
Fig. IV.5. Effets moyens pour BD77……65
Fig.IV.6. Interactions entre les paramètres ([JD],[H_2O_2],[Fe^{+2}]) pour JD106……..67
Fig.IV.7. Interactions entre les paramètres ([JD],[H_2O_2],[Fe^{+2}]) pour BD77. ……..68
Fig. IV.8.Décoloration en système batch des deux colorants JD106 et BD 77……70
Fig.IV.9. Effet de pH sur le rendement de décoloration de JD 106 par procédé Fenton……71
Fig.IV.10. Cinétique de décoloration : (A) JD 106, (B) DB77, par procédé Fenton…….....72
Fig. IV.11. Effets moyens pour JD106……....75
Fig. IV.12. Effets moyens pour BD77……76
Fig.IV.13. Interactions entre les paramètres ([JD],[H_2O_2],[Fe^{+2}]) pour JD106…….…..78
Fig.IV.14. Interactions entre les paramètres ([JD],[H_2O_2],[Fe^{+2}]) pour BD77……..79
Fig.IV.15 . Effets moyens pour JD106……...82
Fig.IV.16. Effets moyens pour BD77……..83
Fig.IV.17. Interactions entre les paramètres ([H_2O_2],[Fe^{+2}]) pour JD106…..**.....** 84
Fig.IV.18. Interactions entre les paramètres ([H_2O_2],[Fe^{+2}]) pour BD77……...… 84

Liste des tableaux

Tableau .I.1. La classification des enzymes selon la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie……...4

Tableau .I.2. quelques peroxydases immobilisées impliquées dans les traitements des colorants textiles…….18

Tableau II.1. Principaux groupes chromophores et auxochromes……20

Tableau .II.2. Les principaux colorants textiles et leurs applications…… .23

Tableau .II.3. Quelques caractéristiques des effluents textiles…….26

Tableau .II.4. Norme algérienne (n° 06-141) des rejets d'effluents d'industrie textile…...27

Tableau .II.5. Estimation de fixation de différents colorants aux fibres textiles……..29

Tableau .II.6. Principales applications des peroxydases sur la décoloration des colorants et effluents textiles……38

Tableau .II.7. Avantages et désavantages de diverses méthodes de décoloration pour les colorants et effluents industriels……39

Tableau .III.1. Caractéristiques physico-chimiques des deux colorants utilisés…….43

Tableau .III.2. Les notions de chaque paramètre pour peroxydase immobilisée…… …52

Tableau.III.3. Tableau des plans d'expériences pour le JD106 et BD77……52

Tableau.III.4. Les notions de chaque paramètre pour procédé Fenton. ……...55

Tableau.III.5. Tableau des plans d'expériences pour le JD106 et BD77……..56

Tableau III.6. Les notions des paramètres [H_2O_2] et [Fe^{+2}] ……..57

Tableau.III.7. Les notions de chaque paramètre de couplage……..58

Tableau .IV.1.Résultats des activités pour l'EB et l'EEPP ……59

Tableau. IV.2. Tableau des résultats des rendements de différentes concentrations des paramètres ……....62

Tableau IV.3. Effets moyens des paramètres ([colorant],[H2O2],[AE])……..63

Tableau IV.4. Interaction entre les paramètres [colorant] et [H_2O_2]……66

Tableau .IV.5. Interaction entre les paramètres [colorant] et [AE]……..66

Tableau .IV.6 . Interaction entre les paramètres [H_2O_2] et [AE]……..66

Tableau.IV.7. Résultats de calcul des nouvelles valeurs de rendement de décoloration pour les deux colorants……..70

Tableau .IV.8. Résultats des rendements des trois paramètres au trois niveau……...73

Tableau .IV .9. Effets moyens des paramètres ([colorant],[H2O2],[AE]) pour JD106 ……..74

Tableau .IV.10. Interaction entre les paramètres [colorant] et [H_2O_2]……...77
Tableau .IV.11 . Interaction entre les paramètres [colorant] et [Fe^{+2}]……77
Tableau .IV.12. Interaction entre les paramètres [H_2O_2] et [Fe^{+2}]……..77
Tableau.IV.13. Résultats de calcul des nouvelles valeurs de rendement de décoloration pour les deux colorants……81
Tableau .IV .14 . Tableau des différents résultats des rendements de couplage……..81
Tableau .IV.15. .Effets moyens des paramétres [H_2O_2] et [Fe^{+2}]……...82
Tableau .IV.16. Interaction entre les paramètres [H_2O_2] et [Fe^{2+}]…….……83
Tableau.IV.17. Résultats de calcul des nouvelles valeurs de rendement de décoloration pour les deux colorants……85

Liste des annexes

Annexe 1 : Tableau des réactions Fenton.
Annexe 2 : Verrerie consommable.
Annexe 3 : Existence de la peroxydase dans la courgette.
Annexe 4 : dosage des protéines.
Annexe 5 : la courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).
Annexe 6 : préparation et étalonnage des colorants.

ملخص: قمنا في هذه الدراسة بمعالجة صبغتين للنسيج:أصفر مباشر 106 و أزرق معلق 77 باستعمال 3 طرق : البيروكسيداز المثبت في ألجينات الكالسيوم, فنتن و الجمع بينهما. أثبتت الدراسة أن درجة حموضة الوسط المثالية للمعالجة الأنزيمية و الكيميائية للصبغتين " هي 2.

نتائج تطبيق طريقة " TAGUCHI" ذات 3 عوامل على 3 مستويات هي كالتالي:

♦ في حالة المعالجة الأنزيمية, دراسة تأثير تراكيز الصبغة, الماء المؤكسد و الأنزيم و التداخل بين هذه العوامل أثبتت أن تأثير تركيزي الصبغة و الأنزيم فاق تأثيرتركيزالماء المؤكسد؛ كما أن تداخل تركيزي الصبغة و الأنزيم أكبر من التداخلات الأخرى. النسب القصوى لإزالة أ م 106 و أم 77 فاقت على الترتيب : 40 % و 67 %. أيضا, يمكن إزالة الصبغتين بواسطة البروكسيداز المثبت عدة مرات دون نقص كبير في المردودية.

♦ في حالة المعالجة الكيميائية, تمت دراسة تأثيرات العوامل الثلاثة على مردودية الإزالة و التداخلات فيما بينها و تحصلنا على النسبة القصوى للمردودية للصبغتين أ م 106 و أم على التوالي : 96 % و 89 %.

♦ في حالة الجمع بين المعالجتين و من أجل تركيز ثابت للصبغتين, توصلنا إلى تحسين المردودية بنسبة 32 % و 53% للصبغتين أ م 106 و أم 77على التوالي مقارنة مع المعالجة الأنزيمية.

الكلمات المفتاحية: صبغة, معالجة, بيروكسيداز مثبتة, فنتن, جمع بين معالجتين.

Résumé : Dans ce travail nous sommes intéressés à traiter séparément deux colorants textiles par 3 procédés : peroxydase immobilisée dans l'alginate, Fenton et couplage entre les deux. L'effet de pH du milieu réactionnel sur la transformation enzymatique et chimique des colorants : Jaune Direct106 et Bleu Disperse 77 a été étudié. Le pH2 est le pH optimal pour les réactions de transformations. L'application de la méthode « TAGUCHI » pour 3 paramètres à trois niveaux nous a permis de synthétiser les résultats suivants :

♦Dans le cas du traitement peroxydasique, les effets du colorant et de l'AE sont avérés les plus prédominants ; les interactions entres les paramètres ont été étudiées. Le rendement maximal de décoloration atteint était plus de 67% et de 40% pour le BD77 et le JD106 respectivement. L'essai du batch successif a permis de réutiliser les billes chargées de peroxydase plus de 3 fois ;

♦Dans le cas du traitement Fenton, l'optimisation des paramètres étudiés a conduit à un rendement maximal de décoloration plus de 96% et 89% pour le BD77 et le JD106 respectivement ; les interactions entre les paramètres ont été déterminées.

Dans le cas du couplage peroxydasique-chimique, et pour des concentrations fixes du colorant, le rendement de décoloration a été amélioré par apport au traitement enzymatique de 32% et de 53% pour le BD77 et le JD106 respectivement.

Mots clés : Colorant, Traitement, Peroxydase immobilisée, Fenton, Couplage.

Abstract : In this work we are interested to treat two textiles dyes separately by 3 processes: immobilized peroxidase in alginate, Fenton and coupling between the two. The effect of pH of the reactional medium on the enzymatic and chemical transformation of dyes: Direct Yellow 106 and Disperse Blue 77 was studied. The pH2 is the optimal pH for the reactions of transformations. The application of the "TAGUCHI" method for 3 parameters at three levels enabled us to synthesize the following results:

♦ In the case of the enzymatic treatment, the effects of the dye and the enzymatic concentration are proven most prevalent; the interactions between the parameters were studied. The maximum of dye removal was more than 67% and 40% for the BD77 and the JD106 respectively. The test of the successive batch made it possible to re-use the beads charged with peroxidase more than 3 times;

♦ In the case of the Fenton treatment, the optimization of the studied parameters led to a maximum of dye removal more than 96% and 89% for the BD77 and the JD106 respectively; the interactions between the parameters were calculated.

In the case of the enzymatic-chemical coupling, and for fixed concentrations of dyes, the dye removal was improved from contribution with the enzymatic treatment of 32% and 53% for the BD77 and the JD106 respectively.

Key words: Dye, Treatment, immobilized peroxidase, Fenton, Coupling.

L'eau est l'élément central de tous les processus socio-économiques, quel que soit le degré de développement de la société. L'augmentation des activités agro-industrielles engendre une pression grandissante sur les réserves en eau douce de la planète. En effet, ces activités génèrent une grande diversité de produits chimiques qui se déversent dans le cycle de l'eau, mettant en péril le fragile équilibre naturel qui a permis à la vie de se développer sur la terre. Souvent, les substances chimiques contenues dans les eaux usées sont difficilement biodégradables et le manque ou l'insuffisance de systèmes de traitement mène ainsi à leurs accumulations dans le cycle de l'eau.

La contamination des ressources en eau, principalement au niveau de la qualité, est un problème qui se pose avec acuité ces vingt dernières années. Les effluents d'origine industrielle, agricole et domestique sont souvent chargés de polluants peu ou non biodégradables. Leur impact sur la faune et la flore est très néfaste. Une sensibilisation des acteurs socio-économiques et du public, accompagnée d'une sévère réglementation en rapport avec les rejets, contribueraient à lutter contre cette dérive et permettraient ainsi de sauvegarder ce qui peut encore l'être.

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 physico-chimiques tels que : l'adsorption sur différents types de supports solides, l'oxydation chimique, la floculation/coagulation. Cependant, ces traitements se sont avérés soit insuffisants (limitation de leur capacité d'oxydation), soit trop onéreux (les polluants éliminés devraient subir encore d'autres traitements complémentaires comme l'incinération et/ou l'enfouissement).Ce qui impose aux chercheurs dernières décennies de trouver un procédés de traitement alternatif moins couteux et mois agressifs pour l'environnement. Le principe de cette technique, appelé communément procédé alternative, résident essentiellement dans l'utilisation des enzymes oxydoréductases tel que la peroxydase et la laccase. Cette technique qui est des 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 minéralisation de ces polluants organiques.

Une des nouvelles classes de techniques d'oxydation: les procédés d'oxydation avancée (POA). Ces technologies ont déjà montré leur potentiel dans le traitement de polluants organiques toxiques et "biologiquement récalcitrants". Ces procédés reposent sur la formation *in situ* des radicaux hydroxyles •OH qui possèdent un pouvoir oxydant supérieur à celui des oxydants

traditionnels. Ces radicaux sont capables de minéraliser partiellement ou en totalité la plupart des composés organiques et organométalliques.

Très peu d'études sont consacrées pour compenser les inconvénients de part et d'autre des procédés traditionnels et/ou alternatifs. Les avantages du couplage sont nombreux, surtout du point de vue réduction des sous produits de transformation qui sont généralement plus toxiques que les molécules d'origine, ou amélioration de la qualité de traitement.

Dans le contexte de tous ce que a été déjà cité, l'objectif de notre étude consiste alors d'une part, de montrer l'efficacité de la peroxydase immobilisée extraite d'une source locale de « courgette » et de procédé chimique d'oxydation de « Fenton », dans la transformation de colorants de deux familles : azoïque : Jaune direct 106 et antraquinonique : Bleu dispersé 77. Et d'autre part, d'appliquer un procédé de couplage entre les deux procédés déjà caractérisés leurs efficacités de décoloration.

Ce travail de mémoire est constitué de deux parties :

Dans la première partie, nous avons donné une synthèse bibliographique qui rassemble deux chapitres, le premier sur les peroxydases : leurs types, leur cycle catalytique et leurs différentes applications biotechnologiques ; le second sur les colorants textiles et les différentes méthodes de traitement des effluents colorés, plus précisément les méthodes enzymatique et l'application du procédé Fenton. Ce chapitre se termine par une petite synthèse bibliographique sur quelques avantages de couplage des procédés.

La deuxième partie, est consacrée en traitement des colorants en utilisant la méthode des plans d'expériences, et cela par application de :

♦ La peroxydase immobilisée dans les billes d'alginate ; où nous allons optimiser en premier lieu le pH et le temps de contact, puis nous allons étudier l'effet des concentrations des substrats et de l'enzyme sur le rendement de décoloration et élaboration d'un modèle des résultats obtenus.

♦ Réactifs de Fenton ; où nous allons optimiser le pH et le temps de la réaction de décoloration, ensuite, nous allons étudier l'effet des concentrations de colorant, et des réactifs Fenton sur le rendement de décoloration et élaboration d'un modèle des résultats obtenus.

♦ Couplage des procédés précédents, par étude de l'effet des concentrations des deux réactifs de Fenton et élaboration d'un modèle des résultats obtenus.

A la fin, on termine par une conclusion générale qui résume tous les résultats établis au cours cette étude, et des perspectives achèveront ce travail.

I.1. Généralités sur les enzymes[1]

Les enzymes sont des catalyseurs biologique capables de réaliser la plupart des réactions biochimiques avec une efficacité extraordinaire. Les réactions chimiques dans les systèmes biologique se font rarement en l'absence d'enzyme. Par ailleurs, une enzyme ne favorise pas seulement une réaction chimique donnée, elle empêche aussi la présence de réactions secondaires gênantes. Ainsi les enzymes sont douées des activité suivantes :

- Elles permettent d'atteindre rapidement l'état d'équilibre de la réaction sans le modifier.
- Elles ont une grande spécificité de substrat
- elles accélèrent des réactions chimiques spécifiques en solution aqueuse, dans des conditions de température en des pH généralement très douces

Cependant, au cours des ce dernière années, le nombre d'enzyme connue à considérablement augmente et les applications sont multiples en chimie analytique, en pharmacologie, en toxicologie, dans l'industrie agro-alimentaire et dans le secteur biomédical.

I.1.1. Classification et nomenclature[1]

A l'heure actuelle, un grand nombre d'enzymes sont reconnues par suite de développement rapide de l'enzymologie. 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. Une autre d**é**nomination, dans la quelle un suffixe « ase » est ajoutée soit au substrat, soit au type de réaction catalysé. En 1964, l'Union Internationale de Biochimie a établi une nomenclature où chaque enzyme porte un numéro de 4 chiffres (E.C.W.X.Y.Z) :

- Le premier chiffre correspond au type de la réaction catalysée, (Tableau I.1).
- Le deuxième et le troisième chiffre peuvent avoir différentes signification, (Tableau I.1).
- Le quatrième chiffre est le numéro d'ordre de l'enzyme dans le groupe.

Tableau I.1. La classification des enzymes selon la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie [1]

Classe	***Type de réaction catalysée***	***X***	***Y***
1-Oxydoréductase	Réactions d'oxydoréduction	Groupe donneur	Groupe accepteur
2-Transférase	Transfert d'un groupement chimique d'une molécule à une autre.	Groupe transféré	Détail sur ce groupe
3-Hydrolase	Hydrolyse des liaisons.	Lien hydrolysé	----------
4-Lyases	Clivage par élimination de liaisons C-C, C-O, C-N. une double liaison est formée dans ces réactions	Lien brisé	Lien enlevé
5-Isomérases	Changement de configuration d'une molécule	Type de réaction	Type de molécule isomérisée
6-Ligases	Formation des liaisons avec clivage de l'ATP	Type de liaison formée	----------

I.1.2.Catalyse enzymatique

Pour que l'enzyme fonctionne , elle doit se combiner avec son substrat .La structure de chaque enzyme présente un site actif, capable de fixer spécifiquement le substrat, et contenant les groupements catalytiques responsables de la transformation de ce dernier en produit .

La catalyse enzymatique repose sur les mêmes principes que la catalyse chimique. l'enzyme, permet d'augmenter la vitesse d'une réaction sans modifier les fonctions thermodynamiques de celle-ci et d'abaisser l'énergie d'activation de la réaction, (fig.I.1.a), en augmentant le nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps, (fig.I.1.b).

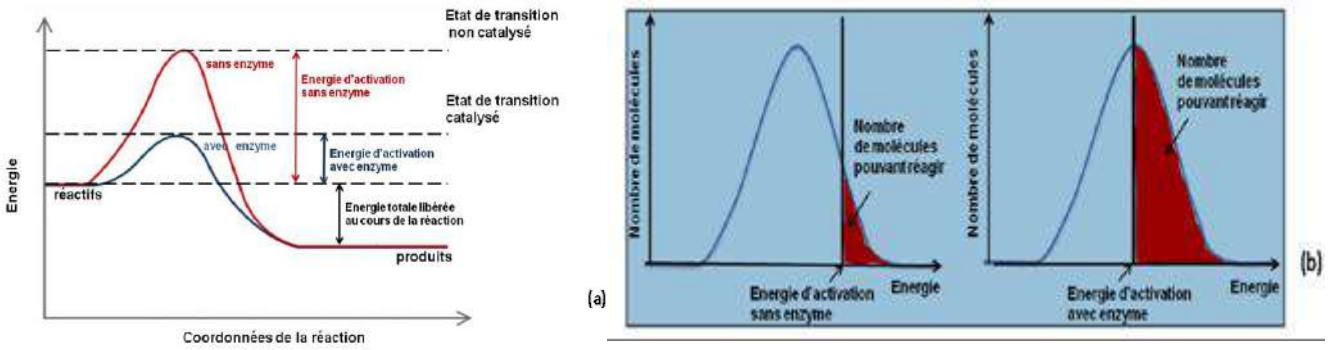


Fig.I.1 .Diagramme énergétique d'une réaction chimique catalysée par une enzyme. Effet de diminution de réduction de l'énergie d'activation sur le nombre de molécules convertis.

♦ Modèle de Michaëlis & Menten

La réaction enzymatique globale est composée de deux réactions élémentaires : le substrat forme d'abord un complexe avec l'enzyme, puis ce complexe se décompose en produit et enzyme.

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

Les principes généraux des réactions chimiques s'appliquent aux réactions enzymatiques. Dans une réaction enzymatique, le taux de catalyse (v) est aussi la variation dans la concentration du produit final par unité de temps. La vitesse globale de la réaction est définie :

$$v = \frac{dP}{dt} = k_2[ES]$$

l'équation de Michaëlis & Menten (équation 1), repose sur l'hypothèse qu'un équilibre rapide entre les concentrations en enzyme, en substrat et en complexe enzyme-substrat s'établit au cours de la réaction catalysée. La concentration totale du substrat $[S]_0$ doit être très supérieure en comparaison à celle de l'enzyme $[E]_0$.

La vitesse de la réaction s'écrit sous la forme appelée l'équation de Michaelis-Menten :

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

où :

V_{max} :Vitesse de la réaction lorsque l'enzyme toutes les molécules de l'enzyme sont complexées au substrat $V_{max} = K_2 [E]_0$

K_M : Concentration de substrat lorsque l'enzyme est « à demi-saturation » i.e. lorsque la moitié des molécules d'enzymes sont complexées au substrat $K_M = K = \frac{[E][S]}{[ES]}$.

Les constantes cinétiques se déterminent par plusieurs méthodes. La méthode directe repose sur la linéarisation de l'hyperbole : vitesse initiale en fonction de la concentration initiale en substrat, (v_0=f ([S] $_0$)). La linéarisation qui corresponds à $1/V_0 = f(1/[S]_0)$ est une droite de pente K_M/V_{max} et d'ordonnée à l'origine $1/V_{max}$, est appelée représentation de Lineweaver-Burk.

I.3. Immobilisation des enzymes

Une enzyme immobilisée est une enzyme liée par des moyens physico-chimiques en surface ou à l'intérieur d'un support solide. On cherche généralement à conserver son activité enzymatique, qui a tendance à diminuer après immobilisation du fait de possibles gênes stériques, de limitations dans l'accessibilité au site actif ; et à augmenter sa stabilité dans le temps, ce qui est souvent le cas du fait de la structure plus rigide conférée par l'immobilisation aux enzymes.

On distingue normalement trois types de stabilité pour une enzyme immobilisée:

1. Stabilité de stockage: évolution de l'activité enregistrée dans les conditions usuelles de conservation .
2. Stabilité opérationnelle: évolution de l'activité de l'enzyme pendant des essais répétitifs
3. Stabilité thermique: résistance à des températures plus élevées aux quelles l'enzyme est normalement dénaturée Par exemple, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été greffée à l'aide du glutar aldéhyde sur la surface du verre poreux. On observe une augmentation de la stabilité de la GAPDH fixée sur la surface par liaison covalente par rapport à la stabilité de la même enzyme en phase homogène.[13]

I.3.1. Propriété des enzymes immobilisées

L'immobilisation des enzymes conduit souvent à un changement de leurs propriétés physico-chimiques et cinétiques

♦*.1. Propriétés physico-chimiques*

Une des propriétés importants et caractéristiques de l'immobilisation et l'amélioration de la stabilité dans le temps et de la résistance vis-à-vis de la dénaturation .La stabilité de l'enzyme immobilisé dépend beaucoup du microenvironnement imposé par le support. En effet, le pH de l'enzyme peut être modifié, en particulier lorsque la réaction enzymatique met en jeu une libération ou une consommation de protons.[14]

♦*.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 de site enzymatiques. 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. [14]

I.3.2. Méthodes d'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 [14].

Les enzymes immobilisées sont définis comme des enzymes physiquement limitée ou localisée dans une région définie de l'espace avec la rétention de leurs activité catalytique, et qui peuvent être utilisés de façon répétée et continue [15].

Plusieurs techniques d'immobilisation existent :

I.3.2.1.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 [16].

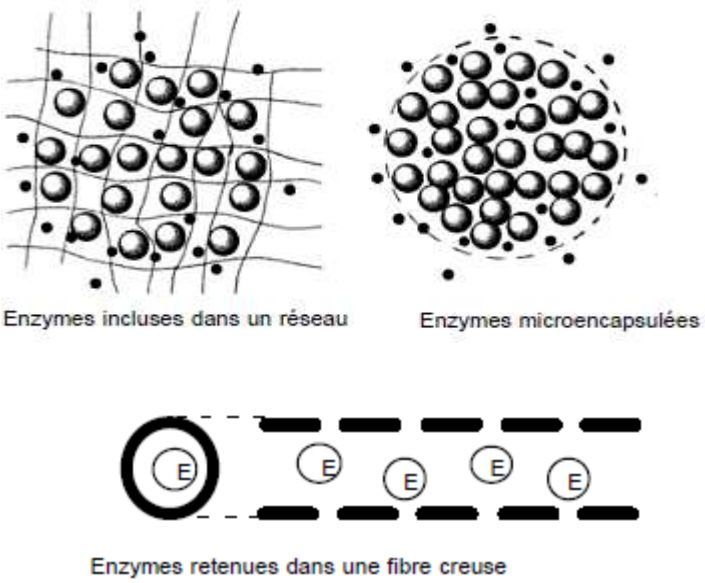


Fig. I.4 : Immobilisation par inclusion [15].

I.3.2.2. Immobilisation par liaison :

❖ **.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 de 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 [17] :

- **Adsorption :** La fixation est réalisée grâce aux liaisons secondaires (van der Waals, liaison hydrogène) qui s'établissent entre des groupements d'atome d'enzyme et des groupements de support (Fig. II.9). La fixation est réversible, non spécifique et les risques de désorption de l'enzyme sont importants [18].
- **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 (fig. I.5). La fixation au support est facile mais elle cause des changements dans la conformation de l'enzyme et son site actif [17].

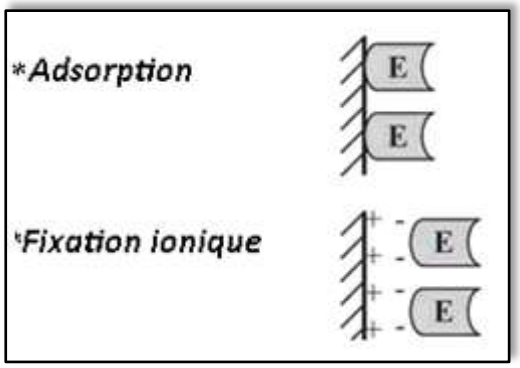


Fig. I.5. Les deux modes de fixation non covalente à un support [17].

- **Fixation covalente :** La fixation covalente est basé sur l'adhésion d'enzyme est le support par des liaisons covalentes, les condition d'immobilisation par liaison covalente sont plus compliqués que celles pour la fixation ionique et l'adsorption (Fig.I.6).Ainsi, cette liaison peut altérer la structure et le site actif d'enzyme, résultant 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 forte [18] .

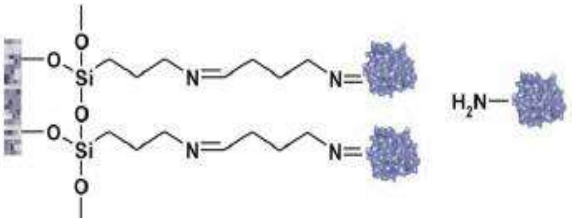


Fig.I.6. Liaison covalente entre l'enzyme et le support [19].

❖ **2.Réticulation :**

Cette méthode est basée sur la formation des liaisons covalentes entre les molécules d'enzyme par l'adition des agents chimiques (dans la plus part de temps on utilise le glutaraldéhyde) (Fig.I.7).

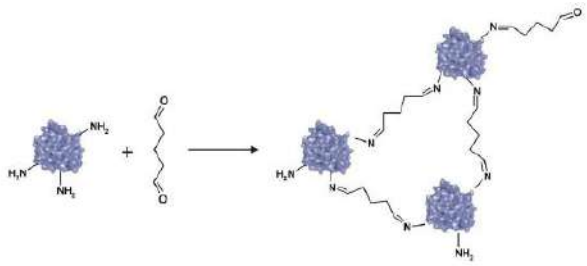


Fig.I.7. Réticulation des enzymes [19].

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 [17].

❖ **3. Immobilisation par inclusion dans l'alginate :**

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

L'acide d'alginique est un polymère constituons de résidus d'acides α -L-gluconique et

β-D –mannuronique (Fig. I.8).L' alginate est principalement extrait à partir de Macrocystis

pyrifera.L'alginate est l'un des biopolymères le plus fréquemment utilisées pour l'immobilisation par inclusion non seulement grâce à ses propriétés de gélification mais aussi grâce à sa non toxicité .La gélification qui est l'une des principales propriétés des l'alginates est due au fait qu'il réagissent avec les cations divalents (sauf le magnésium) et précipitent lorsque ces cations sont en excès[20].

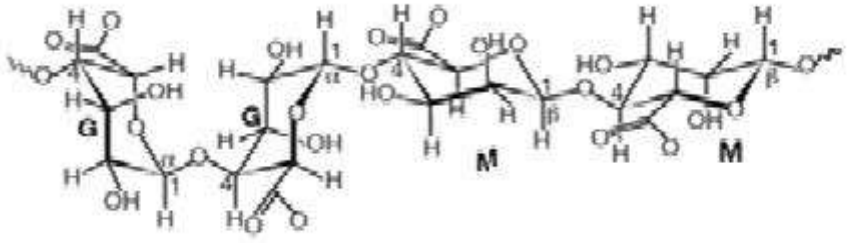


Fig. I.8. Structure de l'alginate (**G :** acide guluronique.**M :** acide mannuronique)[20].

La calcium est le cation le plus utilisé car il est simple, disponible, et peut couteux. Lorsque la solution de l'alginate de sodium est en contact avec une solution riche en cations Ca^{+2} , une structure semi-solide se forme se forme immédiatement dans sa couche externe. Ensuit,les cations Ca^{+2} passe à travers la couche externe pour former la structure de gel pour l'ensemble d'alginate.

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

Le gel d'alginate de calcium est stable dans une large gamme de pH (pH 2-10) et de température (jusqu'à 85°C).Cependant, le gel peut être détruit dans un environnement à une forte concentration en sodium, potassium ou magnésium [21].

I.3.3.Intérêts d'immobilisation

Les enzymes immobilisées offrent certaines propriétés opérationnelles plus que les enzymes ordinaires tels que [19].

- L'augmentation de stabilité d'enzyme a pH élevé et la tolérance a des hautes températures.
- Utilisation répétitive d'enzyme.

- L'habilité d'arrêter la réaction rapidement par l'arrachement d'enzyme de milieu réactionnel.
- Le produit obtenu n'est pas contaminé par l'enzyme.
- La séparation facile d'enzyme du produit.
- Permettre le développement d'un système réactionnel à multi enzyme.
- Réduit le problème de traitement des effluents.
- L'immobilisation offre certains effets protecteurs contre l'inactivation des enzymes ou leur inhibition.

I.3.4.Applications des enzymes immobilisées

Les enzymes ont peur tés le début comme un mode privilégié d'utilisation de la biocatalyse. Ces biocatalyseurs peuvent présenter cependant quelques inconvénients parmi lesquels leur manque de stabilité et leur coût qui on pu paraître rédhibitoires pour certaines applications. A ces inconvénients ont répondu les techniques d'immobilisation contribuant à la stabilisation des enzymes dans leurs conditions d'utilisation, à leur récupération éventuelle pour réutilisation et à la possibilité de développer des réacteurs fonctionnant en continu. Ce qui a ouvert la voie à l'exploitation industrielle. D'autres avantages majeurs de ces techniques sont d'augmenter, de façon souvent considérable, la productivité des bioréacteurs et la pureté des produits. Les principales Certaines enzymes trouvent.

Des applications dans l'amélioration de gouts désagréables. Par exemple la trypsine peut être immobilisée sur un vers poraux par l'intermédiaire du guttural débye ex agir sur le lait de manière à ralentir et diminuer l'apparition du goût amer. Actuellement on assiste également à un grand regain d'intérêt pour les applications de la trypsine immobilisée dans des microréacteurs, dans le domaine de la protonique.

I.3.5. Applications des peroxydases immobilisées sur le traitement des colorants

Sur le plan de traitement des colorants synthétiques par peroxydases immobilisées, une large application avec plusieurs méthodes et sur plusieurs substrats ont été établies. Les méthodes d'immobilisation appliquées, sont généralement celles citées plus haut, mais récemment de nouvelles techniques ont été mise au point. Le tableau résume quelques travaux sur le traitement des colorants ainsi que les supports d'immobilisation des peroxydases.

Tableau.I.2. quelques peroxydases immobilisées impliquées dans les traitements des colorants textiles.

peroxydase	Support d'immobilisation	Colorant	Nombre de batch	Référence
Courgette (BGP)	Billes d'alginates modifiées	Effluent textile	8	[22]
Courgette (BGP)	Sephadex G-50	8 colorants réactifs	10	[23]
Courgette (BGP)	Alginate de Ca/pectin	2 colorants dispersés	7	[24]
HRP	Acrylamide Alginate de Ca	Colorant azoïque	5 2	[25]

I.2. Les peroxydases

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 qualitatif.

I.2.1. Définition

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 [3].

L'hème des peroxydases est constitué par une métalloporphyrine dont l'ion métallique est le fer ferrique (Fe^{3+}) associé a quatre atomes d'azote du noyau tétrapyrrole par quatre liaison de coordination(Fig.I.2).[4]

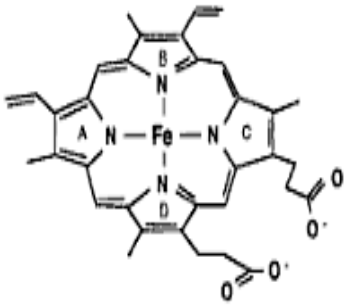


Fig.I.2: Ferriprotoporphyrine IX ou hème b. (A, B, C, D) représentent les quatre noyaux pyrroles [4].

I.2.2. Classification :

On distingue deux grandes familles de peroxydases : lesperoxydasesanimales, principalement détectées chez les animaux, et, par opposition, lesperoxydases non animales détectées chez les plantes, les champignons, les bactéries et les protistes.
Lesperoxydases non animales sont actuellement sous-divisées en 3 classes [5], [6] :

- **les Classes I :** contenant la peroxydase des procariotes tel que : les Catalase-Peroxydases (CP), lesAscorbatesPeroxydases (APx) et les Cytochrome c Peroxydases (CcP).

- **les 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 pourritureblanche.
- **les 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 CAMPESTER RAPIFERA) , courgette (CUCURBITA PEPO).

En générale, les réactions catalysées par les peroxydases des plantes peuvent être représente par la réaction (1), ou le RH et $R^{\cdot}$ représente les substrats et son radical oxydé :

$$H_2O_2+2RH \xrightarrow{\text{peroxydase}} 2H_2O+2R^{\cdot}$$

I.2.3.Cycle catalytique de la peroxydase :

Les peroxydases (EC 1.11.1.X), utilisent l'eau oxygénée comme accepteurs d'électrons pour catalyser les réactions d'oxydation des substrats. En général, les réactions catalysées par les peroxydases est représentée comme suit, [7] :

$$\text{Peroxydase} + H_2O_2 \longrightarrow \text{ComposéI} + H_2O$$

$$\text{ComposéI} + RH_2 \longrightarrow \text{Composé II} + RH$$

$$\text{ComposéII} + AH_2 \longrightarrow \text{Peroxydase} + AH + H_2O$$

Le cycle catalytique des peroxydases commence par une oxydation de l'enzyme et une réduction et l'H_2O_2 pour produire le composé I, Cette étape incluse le transfère d'un oxygène de peroxyde vers la partie ferrique d'enzyme, (le composé I contient un centre oxyferryl avec un fer sous l'état ferryl($Fe^{IV} = O$)). La dernière réaction se fait entre le groupement hème et le substrat, où l'H_2O_2 est réduit en H_2O. d'une part le composé I oxyde le substrat (RH)pour donner le radical correspondant ($R^{\bullet}$), et d'autre part, il réduit pour produire le composé II. Les composés I et II réagissent simultanement avec une deuxième molécule (RH). Comme dernière étape le composé II est réduit de nouveau à l'état ferrique, correspondant à la forme native de l'enzyme, [8] . En résumé, le cycle catalytique est montré sur la figure. 1.

R·

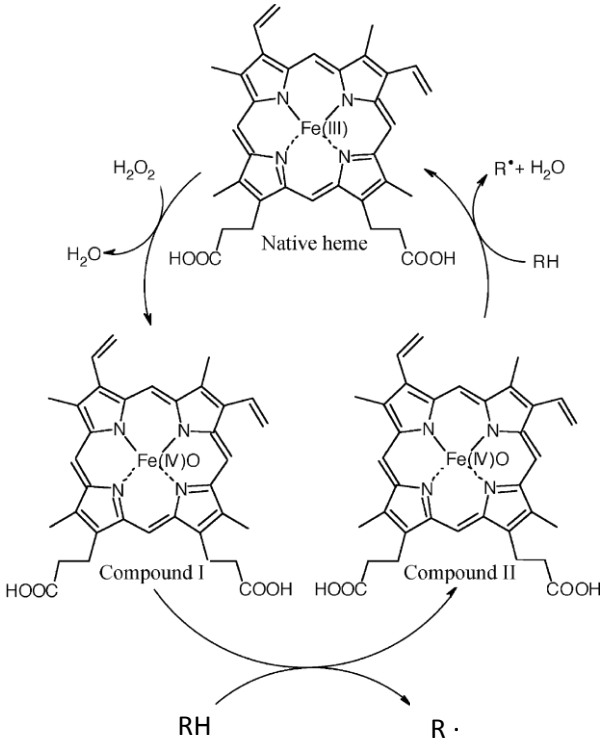


Fig. I.3. Cycle catalytique de la partie Hémine de la peroxydase, [8]

I.2.4. Applications industrielles de la peroxydase :

Vue la grande diversité des peroxydases ; ces dernières occupent une place importante dans nombreux domaines : biochimie, environnement, industrie agroalimentaire, et dans les réactions d'oxydation chimiques. Dans ce qui suit, quelques applications utilisant les peroxydases seront citées.

✓ **Décoloration des colorants synthétiques:** Certaines étudesontmontré que la destructiondescomposéscolorésestimulée de façon significativepardes enzymesoxydatives. Ces colorants contient dans leurs structure des arrangements aromatiques qui leurs fait des substrats agréables pour les différentes types de la peroxydase. Les peroxydases microbiennes sont impliquées pour la transformation des colorants synthétiques (azoïques, anthraquinoniques). Les peroxydases purifiées à partir de plantes ont également été utilisés pour la dégradation des colorants.

✓ **Traitement des composés phénolique :** les peroxydases sont connues aussi pour polymériser certains composés organiques récalcitrants tels que le phénol, les phénols substitués et les amines aromatiques présents dans les eaux usées des raffineries de pétrole et de nombreuses autres industries, y compris plastiques, textiles et les industries forestières. Le

traitement peroxydasique de composés phénoliques se fait leurs polymérisation selon la réaction 2,[9].

Peroxydase

$2\ RH_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + Polymère$

La majorité des études sur la transformation des phénols des effluents, se rapporte sur les peroxydases de raifort, navet, courgette (BGP) sous forme libre ou immobilisée.[9, 10, 11].
Ainsi, Un tel traitement se fait dans des conditions expérimentales douces. Par conséquent, des études de l'effet du pH, la concentration en substrat, le temps de réaction et l'effet de quelques additifs ont été étudiés, pour optimiser des états de réaction, [9].

- ✓ **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 [12].

- ✓ **Biocapteurs à base de la peroxydase :** Un domainequioffre de grands potentiels pour les applications de la peroxydasecomprenant les biocapteursélectrochimiques. Récemment, les électrodes à base de la peroxydaseontavaitlargement utilisés dans lessystèmesd'analysepour la déterminationde peroxyde d'hydrogène et les hydro-peroxydesorganiques. Sous l'état immobilisé, avecuneenzymeproduisantdu peroxyde d'hydrogène, ils peuventêtreexploitéspour la déterminationdu glucose, des alcools, glutamate, la choline.
- ✓ **Désodorisation de lisier de pore :**les composants aromatiques tels que les phénols, les indoles, les acides gras volatiles, l'ammoniac, le sulfure d'hydrogène et les mercaptans sont soient d'abord présents dans le fumier qui est le résultat d'une transformation anaérobie des déchets animaux.

  Un niveau d'odeur élevé dans les bâtiments de confinement peut réduit le taux de croissance du bétail et provoquer la propagation des maladies infectieuses entre les salariées agricoles. Traitements, tels que la gestion alimentaire, l'aération intense et l'application des additifs de lisier ont été utilisé pour diminuer ou éliminer les composés

aromatiques .Mais toutes ces méthodes sont couteuses et nécessitent des connaissances spécialisées.[12]

II.1. Généralités sur les colorants textiles

Les colorants possèdent outre leurs couleur, la propriété de teindre. Cette propriété est à l'origine résulte de l'interaction entre la molécule du colorant et le substrat à teindre. Ainsi, cette interaction se forme entre la partie réactive de la molécule colorante et la molécule à teindre par formation d'une liaison sélective. Les colorants se distinguent des pigments, les premiers sont solubles dans le bain de teinture (aqueux) et les derniers sont insolubles, ils sont mis en suspension dans un liant organique, les deux groupes se regroupent dans la famille des matières colorantes.

En effet, selon le type d'application et d'utilisation, les colorants synthétiques doivent répondre à un certain nombre de critères afin de prolonger la durée de vie des produits textiles sur lesquels ils sont appliqués: résistance à l'abrasion, stabilité photolytique des couleurs, résistance à l'oxydation chimique (notamment les détergents) et aux attaques microbiennes. L'affinité du colorant pour la fibre est particulièrement développée pour les colorants qui possèdent un caractère acide ou basique accentué. Ces caractéristiques propres aux colorants organiques accroissent leur persistance dans l'environnement et les rendent peu disposés à la biodégradation [**1**].

Les matières colorantes sont des composés qui absorbent l'énergie électromagnétique dans le spectre du visible (380 à 750 nm). La transformation de la lumière blanche en lumière colorée par réflexion sur un corps, ou par transmission ou diffusion, résulte de l'absorption sélective d'énergie par certains groupes d'atomes appelés groupes chromophores. Ces groupes comportent généralement des hétéroatomes (N, O..). Les groupes responsables de l'interaction avec le substrat à teindre est un auxochrome. En effet, les colorants consistent en un assemblage de groupes chromophores, auxochromes et de structures aromatiques conjuguées (cycles benzéniques, anthracène, perylène, etc). La molécule colorante étant un chromogène. Plus le groupement chromophore donne facilement un électron, plus la couleur est intense.

Les principaux groupements chromophores et auxochromes sont classés par intensité croissante dans le tableau (II.1) [2].

Tableau II.1. Principaux groupes chromophores et auxochromes, [2].

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

Il est souvent difficile de connaître la composition chimique des colorants car la confidentialité sur la composition chimique est généralement préservée.

La dénomination des colorants comprend trois éléments, [3] :

- Le nom générique de la classe d'application ;
- La couleur ;
- Le numéro d'ordre chronologique d'inscription au "colour index *". (par exemple : CI Direct yellow 106).

II.2. Classification des colorants

La littérature distingue plusieurs types de classifications des colorants textiles : selon l'origine, la structure chimique, le mode d'application sur la fibre et autres…., La classification des colorants selon leur constitution chimique repose sur la nature du groupe chromophore (tableau II.1),[2].

II.2.1. Les colorants azoïques

Ces colorants sont caractérisés par le groupe fonctionnel azo unissant deux groupements alkyles ou aryles identiques ou non (azoïque symétrique et dissymétrique). 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 **[3]**. Les colorants azoïques se répartissent en catégories : les colorants basiques, acides, directs et réactifs solubles dans l'eau, et les azoïques dispersés et à mordant.

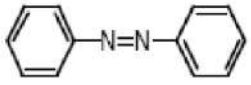


Fig .II.1. Le groupement fonctionnel azo des colorant azoïques.

II .2.2. Les colorants anthraquinoniques

La formule générale de ces colorants dérivée de l'anthracène montre que le chromophore est un noyau quinonique sur lequel peuvent s'attacher des groupes hydroxyles ou amines. Ces produits sont utilisés pour la coloration des fibres polyester, acétate et triacétate de cellulose.

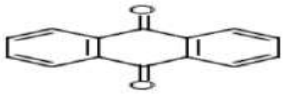


Fig .II.2. La structure moléculaire d'un colorant antraquinonique.

II.2.3. Les colorants indigoïdes

Ils tirent leur appellation de l'Indigo dont ils dérivent. Ainsi, les homologues sélénié, soufré et oxygéné du Bleu Indigo provoquent d'importants effets hypsochromes avec des coloris pouvant aller de l'orange au turquoise

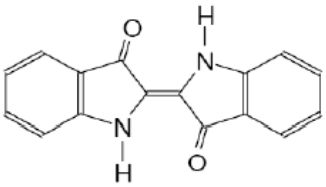


Fig.II.3. La structure moléculaire des colorants indigoïdes.

II.2.4. Les colorants xanthène

Ces colorants sont dotés d'une intense fluorescence. Le composé le plus connu est la fluorescéine. Peu utilisé en tant que teinture, leur faculté de marqueurs lors d'accident maritime ou de traceurs d'écoulement pour des rivières souterraines est établie.

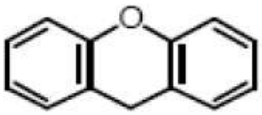


Fig.II.4. La structure moléculaire des colorants xanthène **.**

II.2.5. Les phtalocyanines

Ils ont une structure complexe basée sur l'atome métallique central. Les colorants de ce groupe sont obtenus par réaction du dicyanobenzène en présence d'un halogénure métallique (Cu, Ni, Co, Pt, etc.).

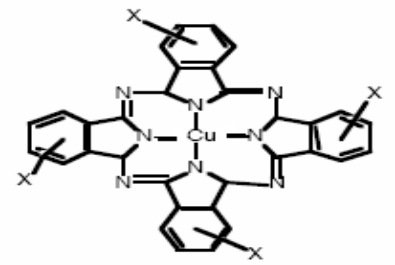


Fig.II.5. Structure moléculaire d'un colorant phtalocyanines.

II.2.6. Les colorants nitrosés

Ces colorants forment une classe très limitée en nombre et relativement ancienne. Leur structure moléculaire est caractérisée par la présence d'un groupe nitro (-NO_2) en position ortho d'un groupement électro- donneur (hydroxyle ou groupes aminés).

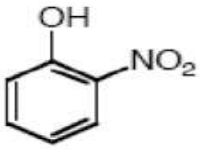


Fig.II.6. Structure moléculaire d'un colorant nitrosés.

II.2.7. Les colorants triphénylméthanes

Les triphénylméthanes sont des dérivés du méthane pour lesquels les atomes d'hydrogène sont remplacés par des groupes phényles substitués dont au moins un est porteur d'un atome d'oxygène ou d'azote en para vis-à-vis du carbone méthanique. Ces colorants 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.

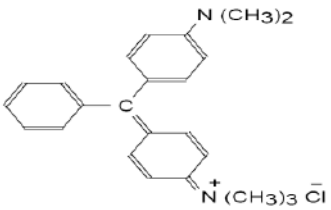


Fig.II.7. Structure moléculaire d'un colorant triphénylméthane.

II.3. Fixation des colorants aux fibres

La nature de groupement auxochrome présentant sur la molécule du colorant ,détermine la solubilité du colorant dans le bain de teinture, son affinité pour les diverses fibres et sur la nature de la fixation. En ce qui concerne l'application du colorant synthétique aux textiles, il est connu que la teinture des fibres de textile dans un bain de teinture aqueux implique quatre étapes [4]:

- *Etape 1*, l'épuisement, où les molécules de colorant migrent du bain de teinture vers la surface de fibre ;
- *Etape 2*, la diffusion des molécules de colorant de surface de fibre dans les régions amorphes de la fibre ;
- *Etape 3*, la migration des molécules de colorant des régions de concentration élevée aux régions de basse concentration afin d'assurer une distribution uniforme la matrice de polymère.
- *Etape 4*, la fixation, dans cette étape, les molécules de colorant agissent l'un sur l'autre avec les groupements chimiques de ses constituants le long de la chaîne de polymère par l'intermédiaire de forces de valence primaires ou de secondaires. Ces interactions peuvent êtres ioniques (colorant acide sur le nylon ou la laine), liaison covalente (colorants réactifs sur le coton), occlusion mécanique (colorants de cuve et colorants de soufre sur le coton), forces secondaire (colorants directs sur le coton), ou solution solide-solide (colorants dispersé sur le polyester). Le tableau(II. 2), montre les principales applications fibre-colorant. Cette dernière étape détermine le taux de fixation de chaque classe de colorant.

Tableau .II.2. Les principaux colorants textiles et leurs applications, [5].

Type de la fibre	***Classe de colorant***
Cellulose	Directs, Réactifs, colorants de cuve, Sulfides, azoiques
laine	Acides
Soi	Directs, Acides
Polyeste	Azoïques, Dispersés
Polyester, cotton	Dispersés, colorants de cuve, colorants insolubles
polyacrylonitrile	Basiques, Dispersés

Polyacrylonitrile, laine	Basiques, Acides
vinylo	Directs, colorants de cuves, Sulfures, Acides,

II.4. Synthèse et réactivité des colorants azoïques et anthraquinoniques

La synthèse de la plupart des colorants azoïques est basée sur la diazotisation d'une amine aromatique primaire pour donner un sel de diazonium. Le diazonium est ajouté à un ou plusieurs nucléophiles. Les groupes amines et d'hydroxyle sont les composants d'accouplement généralement utilisés. La réaction d'accouplement est généralement en position de para en ce qui concerne les groupes aminé- ou d'hydroxyle [**6**]. Le schéma général de la synthèse d'un colorant azoïque est montré comme suit :

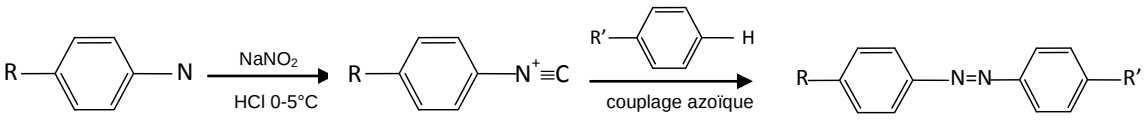


Fig.II.8.Synthèse des colorant azoïques.

Dans un colorant azoïque, la fonction azo est considérée la partie la plus labile. La dégradation des colorants peut être obtenue par réduction ou par oxydation. *La réduction* libère les amines aromatiques primaires incolores, selon la réaction suivante :

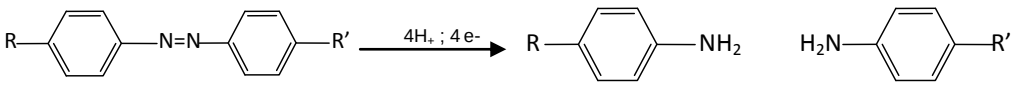


Fig.II.9. La réduction libre des amines aromatiques primaires incolores.

Les mécanismes des réactions de réduction peuvent êtres assurés par réduction chimiques, et réduction enzymatique directe (enzymes bactériennes, fongiques..) et par la réduction chimique.

Un des mécanismes proposés pour l'oxydation de colorants azoïques phénolique est donné sur la figure(II.10). Un ion carbonium est formée au bout de deux oxydations successives à un électron de phénolique par l'enzyme. Quand une molécule d'eau réagit avec le carbone phénolique portant la liaison azoïque, un groupe hydroxy intermédiaire instable se forme, qui se rompt vers le bas dans une quinone et un amidophenyldiazine. Ce dernier composé est

ensuite oxydé par l'oxygène dans le radical phenyldiazene correspondante, qui, après élimination de l'azote donne un radical phényle enfin oxydé par l'oxygène.

Cette mécanisme conduit à la désintoxication de colorants azoïques, car aucun des amines aromatiques sont formé.

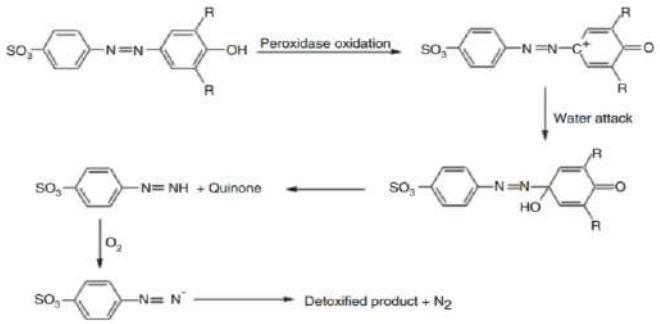


Fig.II.10 : Mécanisme proposée pour l'oxydation d'un colorant azoïque par peroxydase.

La préparation commerciale de colorants d'anthraquinone commence à la synthèse de l'anthraquinone proprement dit. À cet égard, la synthèse en trois étapes comprend:

(1) l'oxydation d'naphtalène en anhydride phtalique, (2) l'acylation de Friedel-Crafts de benzène pour obtenir un céto-acide, et (3) cyclodéshydratation utilisant H_2SO_4. Voir (Fig. II.11) La préparation de colorantes anthraquinones disubstitués 1,4 - utilise les intermédiaires comme indique la figure II. 12

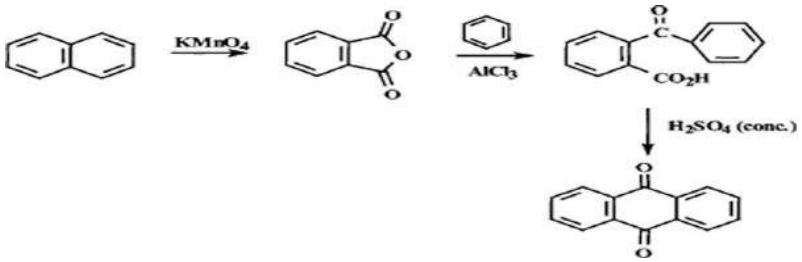


Fig.II.11. Synthèse d'un noyau anthraquinonique.

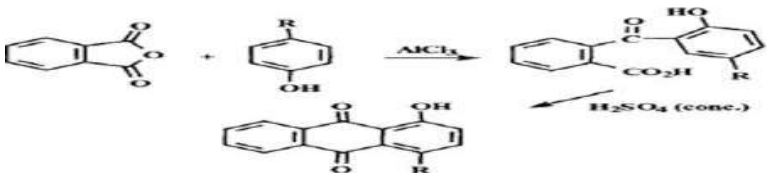


Fig. II. 12. Mécanisme de synthèse d'un colorants anthraquinonique disubstitué 1-4.

II.5. Rejets d'effluents textiles

II.5.1. Propriétés

Les colorants synthétiques sont intensivement employés en industrie textile, photographie, pharmaceutique, agroalimentaire, cosmétique, et industries de cuir. Depuis 1856, plus de 10^5 colorants ont été produits dans le monde entier avec une production annuelle de 7×10^5 tonnes En libérant les eaux usées colorées. L'industrie textile est l'un des plus grands générateurs d'effluents liquides pollués dus aux quantités élevées d'eau utilisée dans les processus de teinture. Selon la classe du colorant, sa perte en eaux usées varie de 2% pour les colorants basiques à 50% pour les colorants réactifs, [**7**].

Actuellement, il a été estimé que 280.000 tonnes de colorants textiles se déchargent annuellement dans les effluents industriels dans le monde entier, [**7**]. Effluents du textile les industries contenant des colorants sont très colorées et être donc visuellement identifiable. Ainsi, ces effluents peuvent contenir outre les colorants, une variété de produits chimiques. Ces polluants importants sont les matière solides en suspension, l'affinité par apport à l'oxygéné le pH , et les matières organiques et inorganiques. Généralement l'effluent textile peut être classé par en 3 catégories, selon leur contenu de COD, (tableau II.3).

Tableau .II.3. Quelques caractéristiques des effluents textiles, [3].

Type d'effluent	***DCO ($mg.L^{-1}$)***	***Conductivité électrique ($\mu S.cm^{-1}$)***
Fortement chargés	1500	2900
Moyennement chargé	970	2500
Faiblement chargé	460	2100

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.4) [8].

Tableau.II.4. Norme algérienne (n° 06-141) des rejets d'effluents d'industrie textile [8]

Paramètre	***Unité***	***Valeur limite***	***Tolérance aux valeurs limites Anciennes installations***
température	°C	30	35
pH	-	6.5-8.5	6-9
DBO_s	mg/l	150	200
DCO	mg/l	250	300
Matières décantables	mg/l	0.4	0.5
Matières non dissoutes	mg/l	30	40
Oxydabilité	mg/l	100	120
Permanganate	mg/l	20	25

II-5-2.Toxicité des colorants textiles

Plusieurs colorants sont visibles dans l'eau même à de très faibles concentrations (< 1 mg L^{-1}). Ainsi, ils contribuent aux problèmes de pollution liés à la génération d'une quantité considérable d'eau usée contenant des colorants résiduels [9]. Le rejet de ces eaux résiduaires dans l'écosystème est une source dramatique de pollution, d'eutrophisation et de perturbation non esthétique dans la vie aquatique et par conséquent présente un danger potentiel de bioaccumulation qui peut affecter l'homme par transport à travers la chaîne alimentaire.

Cependant, la toxicité des différents types de colorants (mortalité, effet mutagénique et cancérigène) a fait intérêt de plusieurs chercheurs aussi bien sur des organismes aquatiques (poisson, algue, bactéries, etc.), sur les mammifères que sur l'activité des bactéries aérobies et anaérobies. En outre, des recherches ont été effectuées pour étudier l'effet des colorants sur le développement des organes des plantes supérieures.

En effet, il a été prouvé que quelques colorants dispersés peuvent causer des réactions allergiques et dermatologiques, [10]. Par conséquent, il s'est avéré que l'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie textile, est reliée à leur exposition prolongée aux colorants azoïques.

La plupart des colorants azoïques ne sont pas initialement toxiques, excepté ceux à groupement amine libre [11]. Cependant, la réduction de ces colorants (rupture de la

liaison azoïque) génère la formation des amines aromatiques qui sont connues mutagéniques et cancérigènes. A titre d'exemple. On peut citer : 1,4-phenylenediamine, 1-amino 2-naphtol, benzidine et benzidine substitués comme o-toluidine (Figure.1) [12-15] .

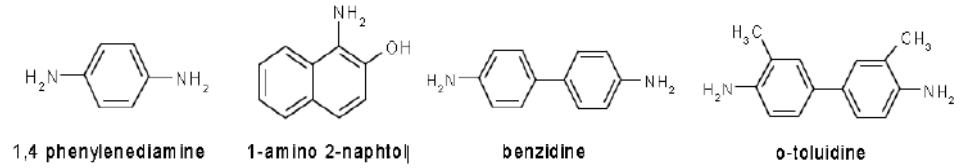


Fig.II.13. Structures chimiques de quelques amines aromatiques toxiques.

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 [16] . La toxicité des colorants azoïques dépend ainsi de la nature et de la position des substituants. Elle est accrue par la présence de substituant sur le noyau aromatique notamment des groupes nitro (-NO_2) et halogènes (particulièrement Cl). En raison des effets mentionnés ci-dessus, il est clair que les colorants, essentiellement les azoïques, ne devraient pas envahir notre environnement.

IV.6. Procédés de traitement des colorants :

Des quantités plus ou moins importantes de colorants sont rejetées dans l'environnement. Ceci est dû en grande partie au degré de fixation des colorants aux fibres textiles. Le tableau(II.5) résume l'estimation des degrés de fixation des différents colorants aux fibres de textile.

Tableau.II.5. Estimation de fixation de différents colorants aux fibres textiles, [16]

Classe de colorant	Degré de fixation(%)	Pertes dans l'effluent(%)
Acide	80-95	5-20
Basique	95-100	0-5
De cuve	80-95	5-20
Direct	70-95	5-30
Dispersé	90-100	0-10
Réactif	50-90	10-50
Soufré	60-90	10-40
Métallifère	90-98	2-10

Comme les colorants azoïques représentent la plus grande classe des colorants du Colour Index (60 – 70%) et leur majorité est constituée par des colorants acides, dispersés, réactifs et directs, ils peuvent être considérés parmi les colorants les plus polluants. Ainsi, des systèmes technologiques pour l'élimination des polluants organiques tels que les colorants sont actuellement bien maîtrisés à l'échelle du laboratoire et appliqués à grande échelle incluant les traitements physiques (adsorption, les technologies membranaires et les procédés de séparation solide-liquide: précipitation, coagulation, floculation et décantation), chimiques (résine échangeuse d'ions, oxydation par: oxygène, ozone, oxydants tels que NaOCl, H_2O_2, réduction ($Na_2S_2O_4$), …) et biologiques (traitement aérobie et anaérobie). Les techniques de dépollution des eaux usées chargées des colorants les plus importants, sont brièvement discutés dans les sections qui suivent.

II.6.1. Méthodes classiques

II.6.1.1. Méthodes physiques

A- Adsorption

L'adsorption est la méthode la plus utilisée dans le traitement des eaux résiduaires physico-chimique, elle est basée sur le contact entre l'effluent et la poudre ou les granules poreux, tels que le charbon actif, l'argile (sciure et écorce de bois…) et les grignons d'olive, [17-21] Comme les colorants ne sont pas tous ioniques, la plupart des adsorbants ne peuvent pas réduire tous les colorants. [22-24] .

Toutefois, cette technique présente l'inconvénient du fait que la pollution déplace de l'état liquide à l'état solide. De plus, ces techniques, non destructives, nécessitent des opérations postérieures onéreuses de régénération et de post traitement des déchets solides [25].

B- Filtration membranaire

Les différentes techniques de filtration (nanofiltration, ultrafiltration, microfiltration) et l'osmose inverse peuvent être appliquées comme procédés principaux ou après traitement pour la séparation et la purification des effluents colorés. Le processus d'osmose inverse peut enlever outre les sels minéraux les colorants réactifs hydrosolubles, [5] . La nanofiltration s'applique surtout au traitement des bains de teinture de colorants réactifs en agissant comme un filtre moléculaire, tandis que la microfiltration retient les matériaux colloïdaux tels que les colorants dispersés ou de cuve grâce à une "membrane écran. L'ultrafiltration ne s'applique qu'à la réduction de la DCO et des solides en suspension, et ne se montre réellement efficace qu'en combinaison avec la coagulation/floculation [1] .

C- Coagulation/floculation

Cette technique de traitement est utilisée pour enlever davantage la demande chimique en oxygène (DCO) et la couleur avant d'un traitement biologique. Ce procédé est basé sur l'addition d'un coagulant qui va former des flocs avec les polluants organiques. Ces flocs sont ensuite éliminés par décantation et filtration. Les coagulants inorganiques donnent les résultats les plus satisfaisants pour la décoloration des effluents textiles contenant des colorants dispersés, de cuve et soufrés, mais sont totalement inefficaces pour les colorants réactifs, azoïques, acides et basiques, [21] .

II.6.1.2. Méthodes biologiques

Les procédés d'épuration par voie biologique sont basés sur la biotransformation microbienne des colorants. Des recherches ont démontré la biodégradation partielle ou complète des colorants par des cultures des bactéries, des fongis et des algues. Par ailleurs, le traitement biologique pour la dégradation des effluents textiles peut être aérobie, anaérobie ou combiné selon le type de micro-organisme utilisé, [26**].**

A- Bactéries

Chung et.al, [27] , ont rapporté que les cultures bactériennes de *Bacillus subtilis* étaient capables de dégrader des colorants azoïques. D'autre études ont prouvé la décoloration des mélanges des colorants par les bactéries anaérobies en 24 à 30h seulement,[28] , tandis que

les colorant azoïques résistent aux transformations bactériennes sous conditions aérobies, par présence de l'oxygène qui inhibe la réduction des ponts azoïques, [29]

Pearce et .al(2003), [30] ont décrit l'utilisation des cellules bactériennes entières pour la réduction de colorants azoïques hydrosolubles des effluents textiles. Ainsi, il a été rapporté que les cellules de *Kocuria rosea* ont le potentiel de décolorer les colorants azoïques, triphénylméthane et d'autres colorants industriels ; vert malachite, orange méthylique, bleu réactif 25, bleu direct 6.

La biodégradation des colorants anthraquinoniques par plusieurs bactéries a été récemment étudiée par Seignez et. al, [31].

B- Fongis

La classe la plus efficace des micro-organismes responsable à la décomposition des colorants synthétiques est : les mycètes (WRF) white Root Fongis. Les mycètes produisent les enzymes ligninolytique extracellulaires non spécifiques capables de la dépolymérisation et de la minéralisation aérobies étendues des composés xenobiotics, aromatique et/ou les colorants organiques, [32]. Les enzymes extracellulaires principales participant à la dégradation sont la peroxydase de lignine, peroxydase de manganèse, laccase, [33]. En plus de la biodégradation enzymatique, les mycètes peuvent décolorer des solutions par biosorption, [34]. Ainsi, la Dy-peroxydase extraite de *Geotrichum candidum* Dec1est capable de dégrader le Bleu Réactif 5 en acide phtalique et autres composés. [35]

D'autres classes de fongis citées dans la littérature comme *Trametes versicolor* qui est capable de dégrader les colorants anthraquinoniques, azoïques et les colorants indingo, *Pleurotus ostreatus* et *Phanerochaete chrysosporium* transforment les triphénylméthanes, ainsi, les enzymes de *Phanerochaete chrysosporium ont* été utilisées pour la biotransformation de toutes les classes de colorants, [36].

C- Algues

L'azoréductase des algues était l'enzyme principale responsable de la dégradation des colorants azoïques en amines aromatiques en cassant les liaisons azoïques (Liu et Liu 1992). Ainsi, la biodégradation de ces colorants est assurée par *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* et *Oscillatoria tenuis*. Le potentiel des espèces de *Cosmarium* sp, appartenant aux algues vertes, a été étudié comme matière biologique viable pour le traitement biologique des colorants triphénylméthanes[36].

En outre, la majorité des colorants sont très stables et non biodégradables. Néanmoins, si ces techniques sont adaptées à un grand nombre de polluants organiques, elles ne sont pas toujours applicables sur les effluents industriels en raison des fortes concentrations de polluants, de leur toxicité qui entraînerait la mort des microorganismes ou de leur très faible biodégradabilité. Ces techniques génèrent des quantités importantes de boues biologiques à retraiter.

II.6.1.3. Méthodes chimiques

Les techniques d'oxydation chimique sont généralement appliquées quand les procédés biologiques sont inefficaces. L'oxydation chimique est souvent appliquée pour le traitement des eaux usées contenant des polluants non biodégradables et /ou toxiques et de fortes concentrations que les autres procédés ne peuvent pas traiter ou transformer en produits biodégradables et/ou non toxiques. Ainsi, l'oxydation chimique se révèle un procédé efficace de traitement des eaux usées.

Les procédés classiques d'oxydation chimique sont basés sur l'ajout d'un agent oxydant dans la solution à traiter. Les principaux agents oxydants sont : Cl_2, O_3, O_2, H_2O_2, l'utilisation d'oxydant seul n'est pas efficace pour la plupart des produits organiques. Il a été observé que l'oxydation chimique avec l'un de ces oxydants n'est pas toujours efficace pour le traitement des polluants organiques persistants, [26, 28, 37]. Dans ce cas, on fait appel aux procédés d'oxydation avancée.

II.6.2. Méthodes alternatives

II.6.2.1. Méthodes d'oxydation avancée

Introduction

Les techniques d'oxydation avancée TOA sont des procédés de traitement des effluents aussi bien liquides que gazeux qui ont connu une évolution rapide au cours des vingt dernières années. Elles appartiennent à la dernière génération de techniques mises au point dans ce domaine.

Le principe de réaction d'oxydations avancées est basé sur la génération des radicaux hydroxyles $OH^{\bullet}$, (voir figure II.14), [38] qui ne sont pas sélectifs et réagissent rapidement avec les composés organiques **[**39,40**]**, en conduisant en une minéralisation complète ou partielle des polluants organiques en CO_2, H_2O et autres produits inorganiques ; ou en produits intermédiaires biodégradables. C'est pour cette raison que les potentialités offertes par ces procédés peuvent être combinées avec un traitement biologique en procédant, en aval

ou en amont de ce dernier, à une dégradation oxydante des substances toxiques réfractaires **[41].**

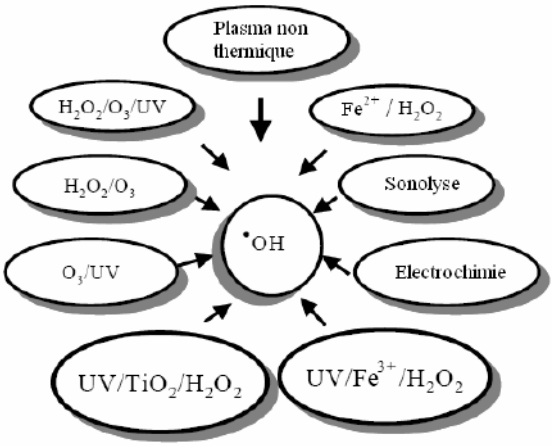


Fig.II.14. Principaux procédés de production des $OH^{\bullet}$. [42]

A. Procédés photochimiques

Les rayonnements ultraviolets sont très utilisés dans le traitement des eaux, soit seuls, soit combinés avec des systèmes oxydants, principalement le peroxyde d'hydrogène, l'ozone, ou le réactif de Fenton.

♦**.1. Photolyse de O_3 :** Le processus d'ozonation combiné est basé sur homolyse de l'ozone induite par la lumière ($\lambda \leq 315$ nm) :

$O_3 + H_2O \rightarrow 2OH^{\bullet} + O_2$……..(1)

L'application de ce procédé aux eaux très chargées en particules ou composés colorés est délicate, en raison de la moindre efficacité de l'irradiation UV, [43].

♦**.2. Photolyse de H_2O_2,** des longueurs d'onde UV de 200 à 280 nm provoquent la décomposition de H_2O_2, ce qui génère des radicaux hydroxyles, avec un rendement quantique de deux $OH^{\bullet}$ formés par photon absorbé [44,45]:

$$H_2O_2 + h\upsilon \rightarrow 2\ OH^{\bullet} \quad \text{.....(2)}$$

♦**.3. Photo-peroxonation $O_3/UV/H_2O_2$,** l'ozonation couplée à la fois au rayonnement UV et au peroxyde d'hydrogène assure une meilleure décomposition de l'ozone que le procédé précédent, par accélération de la décomposition de l'ozone, d'où une élévation de génération de radicaux hydroxylés:

$2\ O_3 + H_2O_2 + h\upsilon \rightarrow 2\ OH^{\bullet}$

Cette méthode a été utilisée par Shu and Chang [46] pour la décoloration de C.I. Acide noir 22. Cependant, le coût global de ce procédé est très élevé, et son application reste limitée à des cas bien spécifiques.

B. Procédés photocatalytiques

♦**.1. Photo-Fenton $Fe^{2+}/H_2O_2/UV$,** Dans ce cas, le système Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2) est mis en œuvre en présence de rayonnements UV, qui favorise la régénération du Fe^{2+} à partir de la photolyse du Fe^{3+}. Plus souvent, le Fe^{2+} initial est remplacé par du Fe^{3+} en quantités catalytiques. Dans les conditions optimales de pH(~3), les ions ferriques s'hydrolysent pour donner principalement $Fe(OH)^{2+}$. L'irradiation UV ($\lambda > 300$ nm) d'un tel système permet de générer *in situ* le Fe^{2+}, qui réagit alors de suite avec le peroxyde d'hydrogène pour produire des radicaux hydroxyles, régénérant ainsi le Fe^{3+} dans le milieu et le cycle reprend:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^- + OH^\bullet$$
$$Fe^{+3} + H_2O + h\upsilon \rightarrow Fe^{2+} + H^+ + OH^\bullet$$
$$H_2O_2 + h\nu \rightarrow 2OH^\bullet$$

L'efficacité du procédé photo-Fenton dépend fortement du rapport des concentrations $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ présent dans la solution et du pH de ce dernier [47]. Le procédé photo-Fenton a fait ses preuves pour la dégradation de nombreux polluants et semble notamment adapté pour le traitement de substances biorécalcitrantes, comme les phénols [48,49], les colorants [50,51-53] ainsi que les pesticides [47,54].

♦**.2. Photocatalyse avec TiO_2,** Le dioxyde de titane (TiO2) est le photocatalyseur le plus utilisé en traitement d'eau résiduaire industrielle [55,56]. Ce semi-conducteur est biologiquement et chimiquement inerte, stable (en milieu acide et basique), insoluble, non toxique et moins coûteux que. Sa forme anatase apparaît comme la plus photoactive. Toutefois, il n'absorbe pas la lumière dans le spectre du visible, mais seulement dans le domaine UV, typiquement $\lambda < 387$ nm.

C.Procédés d'oxydation chimiques

♦**.1. Peroxonation (O_3/H_2O_2),** La décomposition de O_3 en présence de H_2O_2 conduit à la formation des radicaux réactifs selon l'équation.

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

L'efficacité de la peroxonation est limitée par la vitesse de réaction entre O_3 et H_2O_2 [2]. Ce système est affecté par la faible solubilité de O_3, la forte consommation énergétique et la

dépendance de nombreuses paramètres tels que le pH, la température, la présence des réactions parasites consommant les HO• et le type de polluant [57]. En revanche, l'ozonation et la peroxonation présentent l'avantage par rapport aux procédés photochimiques, de pouvoir fonctionner dans une eau à forte turbidité, car le système ne dépend pas de la transmission des rayonnements dans l'effluent.

♦**.2. Procédé Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2),** le réactif Fenton est un mélange constitué de H_2O_2 et les ions ferreux, qui génèrent les radicaux hydroxyles selon la réaction :

$$H_2O_2 + F^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$$

Le fer ferrique formé peut ensuite réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour régénérer le fer ferreux:

$$H_2O_2 + Fe^{3+} \rightarrow F^{2+} + HO_2{}^{\bullet} + H^+$$

Ainsi, la régénération des $OH^{\bullet}$ fait intervenir une séquence de réactions en solution aqueuse à pH acide (2 à 3) (voir Annexe1), d'où la réaction de terminaison est, [58] :

$$OH^{\bullet} + Fe^{2+} \rightarrow OH^{-} + Fe^{3+}$$

Cependant les ions ferriques formés, catalysent la décomposition de H_2O_2 en oxygène et eau, avec formation des ions ferreux et les radicaux hydroxyles. D'une part, les polluants organiques s'oxydent par action des radicaux $OH^{\bullet}$ en produisant les radicaux $R^{\bullet}$, très réactifs, subissant ainsi une oxydation.

Figure (II.5). D'autre part, il a été démontré que si les réactifs sont utilisés en excès, le polluant organique s'oxyde complètement en CO_2 et H_2O et en sous produits organiques et inorganiques. En outre, des études antérieures montrent que l'excès des ions ferreux à pH acide, les $OH^{\bullet}$ s'additionnent aux cycles aromatiques et hétérocycliques comme indique la réaction suivante, [58].

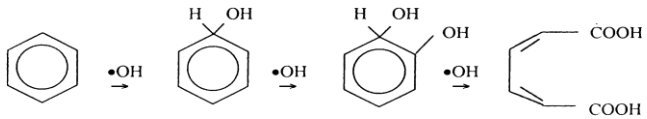


Fig.II.15. Les OH* additionnent aux cycles aromatiques et hétérocycliques.

De nos jours, le réactif de Fenton (Fe^{2+}, H_2O_2) est utilisé pour traiter des eaux usées de différentes compositions contenant des composés organiques toxiques non biodégradables et

réfractaires (effluents agricoles et industriels, phénols, colorants, rejets d'explosifs etc.…) mais aussi des sols pollués. Une étude est portée sur l'effet des concentrations de Fe^{2+}, H_2O_2, pH, Température et la concentration en composés organiques sur le rendement de décoloration par oxydation par le procédé Fenton a été rapportée, [58] .

Pour des valeurs de pH comprises entre 0 et 3, les Équation A-I et A-III sont prédominantes pour un rapport molaire $[H_2O_2]$ / $[Fe^{2+}]$ égal à 1/2. Lorsque ce rapport augmente, l'Équation A-V est favorisée. Le principal désavantage du procédé Fenton est la nécessité de maintenir le pH acide, sinon les ions ferriques précipitent sous forme hydroxyde, **[59]**.

D- Procédés électrochimiques

Les procédés électrochimiques d'oxydation avancée permettent d'éliminer ou de réduire les quantités de réactifs chimiques en produisant les oxydants directement dans le milieu par électrochimie.

♦.1. Electrochimie directe ou Oxydation anodique, Cette méthode est basée sur la génération des radicaux hydroxyles adsorbés (•OH) sur la surface d'une anode de haute surtension d'oxygène par l'oxydation de l'eau :

$$H_2O \rightarrow OH\bullet_{Ads} + H^+ + e^- \text{.....(11)}$$

L'oxydation de nombreux composés organiques en solution aqueuse est réalisée par l'intermédiaire de ces radicaux ainsi générés à l'anode. Les matériaux d'électrode plus efficaces sont ceux possédant de fortes surtensions de dégagement d'oxygène. Parmi ces matériaux, on trouve des oxydes métalliques comme le dioxyde d'étain [60-62], le dioxyde de plomb [60] et le dioxyde de plomb dopé [63], le Pt [64]. L'électrode BDD est ainsi un matériau adéquat pour la production des radicaux hydroxyles, ce qui ouvre de nouvelles applications pour la production d'oxydants puissants et semble favoriser la minéralisation complète de nombreux composés organiques.

♦.2. Electrochimie indirecte ou électro-Fenton, Dans ce cas, il s'agit d'un couplage entre la réaction de Fenton et l'électrochimie [65-68]. Le procédé électro-fenton est basé sur la production continue du peroxyde d'hydrogène par la réduction de l'oxygène sur une cathode de mercure ou feutre de carbone selon l'équation :

Le procédé électro-Fenton se distingue des autres POA par la génération *in situ* du réactif de Fenton conduisant à la production des radicaux hydroxyles, sur une cathode de mercure ou feutre de carbone selon l'équation :

$$O_2 + 2H^+ + 2\,e^- \rightarrow H_2O_2 \quad \textbf{.....(12)}$$

Le fer (catalyseur) est piégé dans le cycle d'oxydoréduction :

$$Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+} \quad .....(13)$$

il n'est pas observé de précipité ferrique, à cause de sa faible concentration et du pH du milieu. Brillas *et al*. [69] ont montré que les électrodes à diffusion d'oxygène (cathodes) peuvent également être utilisées pour réduire l'O_2 en H_2O_2 en milieu acide.

En plus des paramètres influençant le procédé Fenton (pH du milieu, concentration du catalyseur, température), le procédé électro-Fenton dépend de deux facteurs majoritaires comme la nature du catalyseur (Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Ag^+), et l'intensité du courant.

II.6.2.2. Méthodes enzymatiques

Introduction

Les traitements enzymatiques des colorants impliquent des réactions chimiques extrêmement spécifiques et rapides, basées sur l'action des enzymes. Ces méthodes sont classées entre les procédés chimiques et biologiques, [26]. Ainsi, la variété de transformations catalysées par les enzymes a fait ces derniers une cible principale pour l'exploitation des industries biotechnologiques récentes. Cependant, des recherches récentes ont été entrepris pour une optimisation des procédés d'isolement et de purification des enzymes menues de capacité de transformation voire de détoxification des polluants persistants et récalcitrants des effluents industriels, [36] .

Alternativement, le traitement enzymatique a été employé comme étape de traitement combiné pour enlever un ou plusieurs composés qui peuvent interférer suivant processus de traitement. Par exemple, si des composés inhibiteurs ou toxiques peuvent être enlevés sélectivement, la partie du matériel organique pourrait être traitée biologiquement, réduisant au minimum de ce fait le coût du traitement, [70]. Ainsi, les avantages du traitement enzymatique par rapport aux traitements conventionnels peuvent être résumés comme suit, [71,72] :

- Application aux polluants récalcitrants, couvrant un large intervalle de concentrations en polluants, de pH, de température et de salinité ;
- Facilité et simplicité du processus ;
- Absence de biomasse, et réduction de volume de réacteur ;
- Transformation de divers composés aromatiques.

Les enzymes isolées catalysent la détoxication/décoloration des colorants rapidement, (des minutes à peu d'heures) par rapport aux algues et aux mycètes qui prennent plusieurs jours ou même mois pour fournir les mêmes résultats (Sumathi et Manju 2000 ; Borchert et Balance 2001 ; Rodriguez 2009).

Les enzymes oxydoréductase, les peroxydases, les laccases et les oxydases de polyphénol ont montré leur potentiel dans la décoloration et la transformation des polluants aromatiques tels que les phénols, les amines aromatiques, les diphényles, les diphenols et les colorants (anthraquinoniques, azoïques, nitro et nitroso) (Wesenberg et autres 2003 ; Akhtar et autres 2005b) en composés insolubles moins toxiques, qui pourraient être facilement enlevé de la solution (Torres et autres 2003 ; Husain 2006 ; Husain et autres 2009 ; Husain 2010).

♦**.1.Laccases,** (E.C 1.10.3.2), holoenzyme, est une glycoprotéine dimèrique ou tetradimeriques, contenant habituellement quatre atomes de cuivre par monomère. Laccase est une phénol oxydase qui catalyse l'oxydation de plusieurs substances aromatiques et inorganiques avec réduction de l'oxygène en eau [4.97]. Parmi les applications dans les traitements des polluants, laccases catalysent outre l'oxydation des phénols, les amines aromatiques, les composés non phénoliques, (Bourbonnais et autres 1997, Li et autres 1999, Robles et autres 2000), mais aussi la polymérisation des phénols et halogènes, anilines alkyliques. Ainsi, laccases peut agir sur les chromophores tels que l'azo, les triarylmethanes, l'anthraquinoniques et l'indigoïdes.

♦**.2. Peroxydases,** (E.C 1.11.1.7), hémoprotéines, produits principalement par un certain nombre de sources : micro-organismes et de plantes, qui catalysent des réactions d'oxydoréduction en présence du peroxyde d'hydrogène, [S10]. Le tableau récapitule les principales peroxydases impliquées dans le traitement des colorants et effluents textiles.

Tableau.II.6. Principales applications des peroxydases sur la décoloration des colorants et effluents textiles, [**11**]

Source de peroxydase	Colorant / Effluent
MnPeroxydase *Phanerochaete sordida* *Bjerkandera adusta* *Irpex lacteus* **LiPeroxydase** *Phanerochaete chrysosporium* *Pseudomonas desmolyticum*	 Azoiques et anthraquinoniques dyesRB 5 dye bath effluents colorés Bleu de methylène Brillant réactif

DyP Geotrichum candidum Dec 1	Colorants synthétiques
Peroxydase de Radis	Noir acide 10BX Bleu Remazol , Rouge Cibacron Jaune direct 12
Peroxydase de navet	Effluent textile Colorants directs
Peroxydase de courgette	21 colorants textiles et non textiles Effluent textile Rouge dispersé 17 et Marron dispersé 1
Peroxydase de tomate	Colorants directs

II.6.2.3. Couplage des procédés

Les colorants synthétiques sont généralement très résistants aux traitements mentionnés au par avant, comme ils peuvent se transformé en produits plus toxiques qu'eux mêmes. Le tableau présente certains inconvénients des méthodes appliquées au tel traitement.

Tableau.II.7. Avantages et désavantages de diverses méthodes de décoloration pour les colorants et effluents industriels.

Méthode de traitement	Avantages	Désavantages
Physiques Adsorption Filtration membranaire Coagulation/floculation	Efficace, économique Recyclage, appliquées aux effluents les plus complexes, rapide, économique	Déplacement de la pollution. Coût élevé, pas de séparation des produits dissous. Génération d'une autre pollution.
Chimiques	Efficaces, non énergétique	Non efficaces pour les colorants dispersés, production d'amines aromatiques
Biologiques	Décoloration et réduction de COD, minéralisation partielle et totale, production de biogaz.	Procédé lent, traitement des colorants biodégradables seulement, accumulation de biomasse.
MOA	Simple, Minéralisation totale, traitement des colorants non biodégradables.	Coût élevé, possibilité de formation d'amines aromatiques
Enzymatiques	Simple, efficace, rapide, spécifique.	Isolement purification d'enzymes. Transformation de certains types de colorants.

Des études très récentes proposent pour éliminer d'une manière efficace et complète des colorants des effluents textiles par couplages des procédés. Dans un batch séquentiel de traitement des colorants azoïques, [12], les produits du procédé Fenton alimentent un traitement biologique par voie aérobie. D'après Nilesh et.al, le traitement fenton permis une décolonisation et une dearomatisation des colorants, tandis que la deuxième étape, conduit à

une réduction en amines aromatiques. Pratiquement un résultat identique a été établi par Idil et.al, pour une combinaison séquentielle des procédés : Fenton-aérobie et Fenton-anaérobie séparément sur des colorants azoïques et anthraquinoniques. Ces derniers sont généralement non biodégradables, cependant une décoloration complète et une réduction de la COD et de COT a été indiquée. L'avantage du couplage dans ce cas est la transformation des sous produits par oxydation aérobique ou une réduction anaérobiques des colorants.

En ce qui concerne le couplage avec les procédés enzymatiques, peu de travaux ont été signalés. Les résultats de Karimi sur l'effluent coloré de l'industrie papetière indiquent que après le traitement chimique, seulement un rendement de décoloration de 41% est atteint. Un traitement par la laccase ou par la peroxydase a conduit à une décoloration et une dégradation des différents composés de l'effluent.

D'autres couplages peuvent êtres appliqués entre les procédés physiques et chimiques comme : fenton et irradiation, fenton et coagulation, fenton et ultrasons, [13,14,15].

OBIECTIF

Cette partie expérimentale a été réalisée au sein de laboratoire de contrôle de qualité du complexe Antibiotical, SAIDAL de Médéa. Où nous avons essayé d'atteindre les objectifs suivants :

- Extraction et purification de la peroxydase de courgette locale « Cucurbita pepo ».
- Etude de la dégradation de deux colorants textiles JD106 et BD77 par la peroxydase immobilisée.
- Etude de la dégradation des deux colorants JD106 et BD77 par Fenton.
- Etude de la dégradation des deux colorants JD106 et BD77 par couplage de deux procédés : peroxydase immobilisée-Fenton.

III.1. Critères de choix

III.1.1.Choix des colorants

Nous avons choisi ces colorants de deux familles tinctoriales et chimiques distinctes, ainsi qu'ils sont utilisés par une industrie textile algérienne, SOITEX de Tlemcen, d'où les effluentes sont rejetés dans l'environnement sans traitement efficace.

III.1.2.Choix de la source végétale

L'étude de cette enzyme reste jusqu'à l'heure actuelle non pratiquée.

III.2. Matériels et réactifs utilisés

III.2.1.Equipement utilisés:

- Chronomètre.
- Bain-marie.
- Agitateur.
- Centrifugeuse.
- pH-mètre.
- Mixeur.
- Spectrophotomètre UV-Vis (PERKIN-ELMER 550A).
- Balance analytique de précision

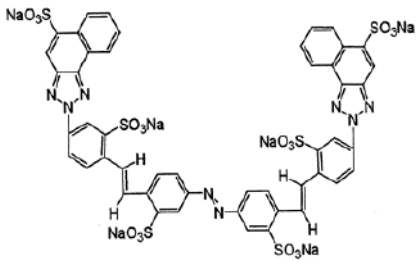
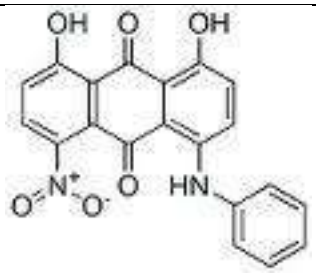
III.2.2. Réactifs utilisés :

Les expériences menées dans le cadre de cette recherche, dans diverses conditions ont nécessité les produits de qualités analytiques suivantes :

- Peroxyde d'hydrogène …….....H_2O_2(30%)
- Phénol ……..…… C_6H_6O
- 4-Amino-antipyrine ……..…… $C_{11}H_{13}N_3O$
- Acétone ……..……. C_3H_6O (85 %)
- Biphtalate de potassium monobasique…….. KH_2PO_4
- Acide chlorhydrique…… HCl
- Alginate de sodium …… $(C_6H_7NaO_6)_n$
- Chlorure de calcium……..... $CaCl_2$
- Sulfate de fer ……..……. $FeSO_4$ (7H2O)
- Chlorure de potassium ……..……. KCl
- Hydroxyde de sodium ……...……. NaOH
- Ethanol ……..…… C_2H_6O(95%)
- Solution tampons de pH 2 à 10
- Réactifs de bleu de Coomassie
- Sérum d'albumine (SAB)

III.2.3.Caractéristiques des substrats utilisés, les principales caractéristiques des colorants utilisés au cours de l'étude sont données sur le tableau (III.1).

Tableau. III.1. Caractéristiques physico-chimiques des deux colorants utilisés :

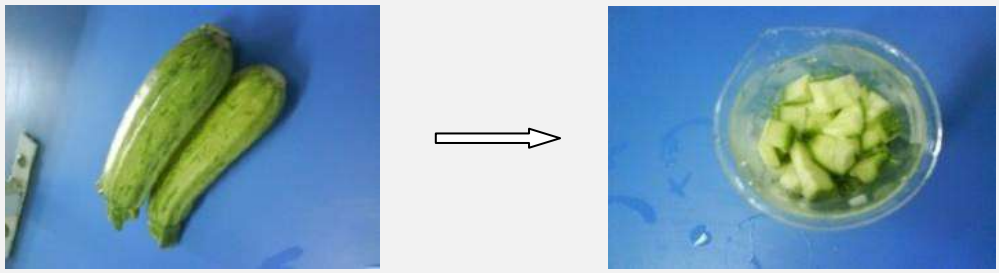
	JD 106	DB 77
Nom selon CI	Jaune direct106	Disperse Blue77
Nom commercial	Jaune Solophényle.	Bleu Marine Bemacron
Formule chimique	$C_{48}H_{26}N_8Na_6O_{18}S_6$	$C_{20}H_{12}N_2O_6$.
Famille	Azoïque	Anthraquinonique.
Domaine d'application.	Teinture de coton, soie, laine, tissu de nylon et industrie de papeterie.	impression et teinture des polyesters.
λ_{max} (nm) (voir Annexe 6)	394	628
Ɛ (l/mol) (voir Annexe 6)	22	11
Masse molaire. ($g.mole^{-1}$).	1333,091	376,32
La couleur	 Jaune orange.	 Blue marine.
Formule développée		

III. 3. Méthodes

III.3.1.Extraction et purification de la peroxydase. [1].

III.3.1.1. Extraction de la peroxydase de la courgette :

100 g de courgette bien rincée avec l'eau distillée et coupée en carreaux puis broyé avec 200 ml d'eau distillée dans un mixeur, on obtient un homogénéisât liquide, ensuite ce dernier est filtré sur multicouche de gaze, tout en evitant les pertes au cour de la filtration. L'extrait enzymatique obtenu est un extrait enzymatique brut. Le protocole experimental de l'extraction est schématisé sur la figure(III.1).



1-100 g de courgette coupées en petit morceaux .



2-Broyage dans un mixeur avec 200 ml d'eau distillée.



4- Obtention d'un extrait Enzymatique brut(EEB).

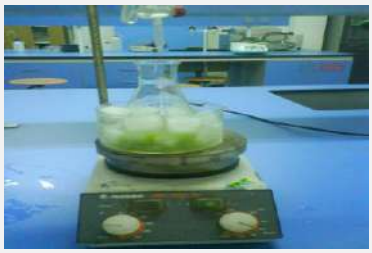


3 - Filtration de mélange obtenu par une gaze

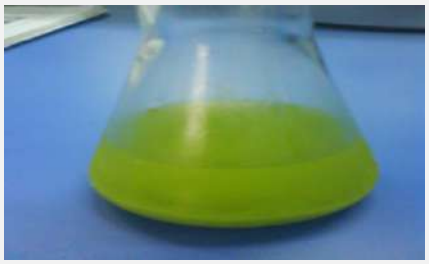
Fig.III.1 . Protocole d'extraction de la peroxydase.

III.3.2.Purification de la peroxydase par acétone, [2]

Nous introduisons dans une burette un volume fixe de l'acétone refroidi à 0°C et un volume équivalent de l'EEB (refroidis préalablement à 0° C pendant 30mn) dans un bêcher mis dans un bain d'eau glacée sous agitation magnétique. L'acétone est ajouté goutte à goutte à l'EB. Le mélange extrait/acétone ainsi préparé est refroidi à 0°C pendant 2h. Après, ce dernier fait objet à une centrifugation à 3000 tr pendant 10mn. Finalement, le culot est récupéré et est dissout dans un volume de 100 ml de tampon pH6. Le protocole de purification est illustré sur la figure (III.2).



1-Adition de 200 ml d'acétone à l'extrait enzymatique Brute (2h) dans le réfrégérateur



2-Après la conservation du mélange



4- Récupération de culot.



3-Centrifugation pendant 10 min à 3000 tour /min.



5-Dissolution de culot dans 100 ml de pH=6

Fig.III.2 . Protocole de purification de la peroxydase.

III.3.2. Caractérisation de la peroxydase

III.3.2.1. Mesure de l'activité peroxydasique[3]

Après chaque purification, l'activité totale de la peroxydase, la quantité totale de protéine, l'activité spécifique, le rendement en activité et le facteur de purification sont déterminés.

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 (1) suivante, [A] :

$$AE = \frac{\left(\frac{dC}{dt}\right) \times Volume\,de\,mélange\,réactionnel}{volume\,d'enzyme\,injectée} \text{.....(1)}$$

Donc nous aboutissons à l'expression de l'activité enzymatique comme suit :

$$\text{AE (UI /ml)} = \left(\frac{dC}{dt}\right) \mathbf{x} \frac{Volume\,de\,mélange\,réactionnel}{volume\,d'enzyme\,injectée} \times 10^3 \text{.....(2)}$$

La mesure d'activité enzymatique peroxydasique basée sur le principe colorimétrique se fait par plusieurs méthodes. Les deux méthodes les plus utilisées sont:

1- utilisation de gaïacol : La mesure d'activité enzymatique de la peroxydase se fait par l'intermédiaire d'un donneur d'électron : le gaïacol (méthoxyl 2-phénol) qui s'oxyde en présence d'enzyme et d'eau oxygénée donnant une coloration orangée. L'activité est mesurée par spectrophotométrie basée sur l'absorbance due à l'oxydation de gaïacol.

2- utilisation de 4-amino-Antipyrine, l'activité enzymatique des extraits a été dosée en se basant sur la réaction entre le phénol et la peroxyde d'hydrogène en présence de 4-Amino-antipyrine et la peroxydase (figure), le produit formé au cours de cette réaction est un chromogène de Quinoneimine .

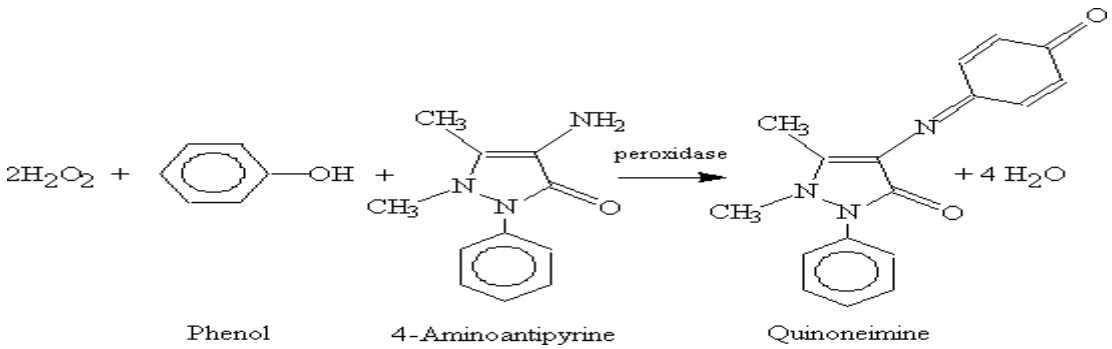


Fig.III.3. la réaction entre le phénol et la peroxyde d'hydrogène en présence de 4-Amino-antipyrine.

Le Quinoneimine est un produit coloré en rose présente des caractéristiques d'absorption particulières dans la gamme visible à une langueur d'onde maximale de 517 nm ce qui permet de maitre 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. Nous avons basé sur ce dernier principe de mésure de l'AE, pour évaluer l'activité peroxydasique des extraits de courgette.

Par conséquent, nous faisons appel à deux expériences :

Expérience 1 *:* Le mélange réactionnel utilisé pour doser cette activité est préparé dans des tubes à essais de 10ml, chaque tube contient le mélange (A) suivant :

- 1ml de H_2O_2 à 0.01M
- 1 ml de phénol à 0.01M
- 1 ml de 4-Amino-antipyrine à 0.001 M
- 2 ml de solution tampon pH 7

Dans les tubes à essais préparés, dont chacun contient 5 ml du mélange (A) le premier servira comme blanc. Dans le $2^{ème}$, la réaction enzymatique est déclenchée par introduction de 0,2 ml d'EE et attendre jusqu'à ce que la couleur se stabilise a longueur d'onde maximal 517 nm. prendre le $3^{ème}$ tube, ajouter 0,2 ml d'EE, et déclencher immédiatement le chronomètre, et noter la DO chaque 10 seconde.

Expérience N 2 *:* préparer une série de tubes à essais avec des concentrations finales en H_2O_2 variant de (2.10^{-5} à 2.10^{-4}) mole/l contenant les réactifs de l'experience1. Attendre jusqu'à ce que la couleur se stabilise en suite utiliser le blanc à la même λ_{max} =517nm puis faire la lecture à l'aide de spectrophotomètre UV-Vis. On trace la courbe d'étalonnage

$DO = f(H_2O_2) = \varepsilon . [H_2O_2]$. (Voir Annexe 5)

III.3.2.2. Dosage de la quantité des protéines :

La détermination de la quantité des protéines totale de chaque extrait (brute, partiellement purifié par acétone), est réalisée selon la méthode de Bradford [5]. Cette méthode est basée sur le changement de couleur de bleu de Coomassie en fonction de la concentration des protéines.

La concentration est déterminée à l'aide d'un courbe étalon de sérum d'albumine bovin SAB ,en ajoutant 0.2 ml de sérum à différentes concentration au 3 ml de réactif de Bleu de

Coomassie .La densité optique de chaque échantillon sera observé en mesurant l'absorbance a 590 nm.(Voir Annexe 4)

III.4.Préparation et étalonnage des colorants. (voir Annexe 6)

III.5. Etude de décoloration de JD106 et BD 77 par la peroxydase immobilisée

III.5.1. Immobilisation de la peroxydase dans les billes d'alginates, [6]

Nous suivant le protocole de l'immobilisation de la peroxydase par l'alginate de sodium comme suit :

- Préparer 20 ml d'une solution enzymatique d'AE (1,4 UI/ml) d'alginates de sodium de 2% (solution A) bien dégager la solution des bulles d'air avec agitation magnétique pendant 1h;
- Préparer 50 ml d'une solution de $CaCl_2$ de concentration de 0,2 M (solution B) ;
- Mettre la solution A dans une seringue et la solution B dans un bécher de 250 ml sous agitation magnétique ;
- Verser goutte à goutte la solution A dans la solution B : les billes forment. Les billes préparées sont caractérisées par la mesure du diamètre moyen, la masse moyenne et AE.

Le schéma (III.4) résume les étapes d'immobilisation de la peroxydase



0,4g d'alginate

Dissolution dans



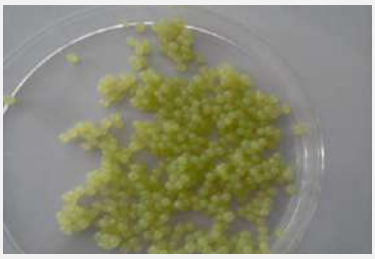
20 ml d'EEPP



Préparation des billes dans 50 ml de $CaCl_2$ (0.2M) .



Homogénéisation de la solution enzyme-alginate (2%).



Conservation des billes à 0°C.

Fig.III.4. Protocole d'immobilisation de la peroxydase de la courgette.

III.5.2. Essais d'optimisation des paramètres de décoloration des colorants JD 106, BD 77 par peroxydase immobilisée.

En premier lieu, nous avons adopté pour l'optimisation du pH du milieu réactionnel et le temps de contact. En second lieu nous avons essayé d'appliquer la méthode des plans d'expérience pour optimiser les concentrations en substrats et en enzyme.

a/ Effet de pH :

Dans des séries des tubes à essais, nous avons introduit :

- 3 ml de solution tampon à pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.
- 1 ml de colorant a une concentration (50 mg/l) de JD et (50 mg/l) de BD77.
- 1 ml de peroxyde d'hydrogène de concentration de 0,1M (JD) et 0,12 M BD77.

La réaction est déclenchée par l'introduction de 0,75 UI /g des billes de la peroxydase, on laisse la réaction se dérouler 30 min (JD 106) et 30 min (BD 77) puis on l'arrête par la centrifugation des mélanges pendant 10 min avec une vitesse de 3000 tour/min. L'analyse des mélanges avant et après traitement se fait par spectrophotomètre UV-visible à λ_{max}.

b/ Effet de Temps de Contact :

Dans une série des tubes à essais nous introduisons :

- 3 ml de solution tampon à pH 2.
- 1 ml de colorant a une concentration (50 mg/l) de JD et (50 mg/l) de BD77.
- 1 ml de peroxyde d'hydrogène de concentration de 0,001M (JD) et 0,02 M BD77.

La réaction est déclenchée par l'introduction de 0,75 UI/g des billes de la peroxydase, on laisse la réaction se dérouler 1,2, 5, 8, 10 et 15 min (JD 106) et 1,2, 5, 8, 10 et 15, 20 min (BD 77) puis on l'arrête par la centrifugation des mélanges pendant 10 min avec une vitesse de 3000 tour/min. L'analyse des mélanges avant et après la centrifugation se fait par un spectrophotomètre UV-visible à λ_{max} (λ_{max} =394nm pour JD106 etλ_{max} =628nm pour BD77).

c- Principe de la méthode TAGUSHI des plans d'expérience utilisée :

Les plans d'expériences dits factoriels utilisent tous le modèle mathématique suivant qui relient la réponse y aux facteurs x1, x2, …xi …xn. Ce modèle théorique est Postulé a priori. Il s'agit d'un modèle polynomial comme indique l'equation (3).

$$y = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + \cdots + a_n \cdot x_n + \sum_{i,j=1\ i\neq j}^{n} a_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \sum_{i,j,k=1\ i\neq j\neq k}^{n} a_{ijk} \cdot x_i \cdot x_j \cdot x_k + \cdots$$

Où:

a_0, a_1 : Coefficients du polynôme.

Les termes produits de type par exemple a_{ij},x_i, x_j correspondent aux interactions. Pour un plan factoriel à 3 facteurs x_1, x_2 et x_3, on obtient par l'équation 4 :

$$y = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_3 + a_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + a_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + a_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + a_{123} \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3$$

Ou :

a_i : les effets des paramètres xi

a_{ij} :les effets des intéractions entre paramètre X_iX_j

$Z_i=\frac{Zi-\Delta(Zi)}{\Delta Z0}$

ou

Zi :valeur des paramètre

$Zi0=\frac{Zi+Zi}{2}$

$X_i=\frac{Zimax-Zimin}{2}$

d- Optimisation des concentrations des substrats et de peroxydase

En appliquant la méthode des plans d'expérience, nous avons 3 paramètres qui influent sur le rendement de décoloration (donc 3 *facteurs*) : [colorant], [H_2O_2] : Co-substrat, [AE], et les niveaux sont fixés à 3 : deux extrêmes et des milieux : alors les essais sont calculés selon 3^3 = 27 essais 'expériences', les notations suivantes sont intéressantes (Tableau III.2).

Tableau.III.2. Les notions de chaque paramètre pour peroxydase immobilisée.

essais	***[JD]*** *(mg/l)*	***[H_2O_2]***	***[AE]*** *(UI/g)*	essais	***[BD]*** *(mg /l)*	***[H_2O_2]*** *(mM)*	***[AE]*** *(UI/g)*
1	20	25	0.08	1	50	10	0.05
2	80	90	0.5	2	135	100	0.5
3	160	150	1	3	220	200	1

Nous travaillons avec un mélange réactionnel de 5 ml contant :

- 3 ml de solution tampon à pH 2.
- 1 ml de colorant à la concentration correspondante de JD et 1 ml de colorant à la concentration correspondante de BD.
- 1 ml de peroxyde d'hydrogène.

La réaction est déclenchée par l'introduction des billes de peroxydase, on laisse la réaction se dérouler pendant le temps optimal (10min) de chaque colorant, puis on l'arrête par la centrifugation des mélanges pendant 10 min avec une vitesse de 3000 tour/min. L'analyse des mélanges avant et après la centrifugation se fait par un spectrophotomètre UV-visible à λ_{max} De chaque colorant.

Le tableau suivait(III.3) est le tableau des plans d'expériences pour le JD et BD :

Tableau.III.3 . Tableau des plans d'expériences pour le JD106 et BD77.

N°essai	[Colorant] (mg/l)	[H_2O_2] (mM)	[AE] (mM)
1	1	1	1
2	1	2	1
3	1	3	1
4	1	1	2
5	1	2	2
6	1	3	2
7	1	1	3
8	1	2	3
9	1	3	3
10	2	1	1
11	2	2	1
12	2	3	1
13	2	1	2

14	2	2	2
15	2	3	2
16	2	1	3
17	2	2	3
18	2	3	3
19	3	1	1
2	3	2	1
21	3	3	1
22	3	1	2
23	3	2	2
24	3	3	2
25	3	1	3
26	3	2	3
27	3	3	3

Pour mentionner l'efficacité des résultats établis à l'issu de l'application des plans factoriels, il est nécessaire de calculer les effets moyens et les interactions entre les paramètres.

Les formules des effets moyens pour chaque paramètre à chaque niveau est donnée comme suit[10] :

Effet de A au niveau i :

E_{Ai} =Moyenne des réponses lorsque A est au niveau i – moyenne générale

L'interaction I_{AiBj} sera recherché à partir des résultats moyennes des essais réalisée lorsque le facteur A se trouve au niveau i et le facteur B au niveau j mais dans ces essais, l'effet principale E_{Ai} joue sur la réponses, de même que l'effet E_{Bj} .

Si M est la moyenne générale des essais, nous pouvons donc écrire :

I_{AiBj} =Moyenne des réponses lorsque (A=i,B=j) – M - $E_{A\,i}$- E_{Bj}

III.5.3.Batch successifs

L'immobilisation des enzymes par voie physique suivant que l'enzyme est inclue dans les billes de l'alginate de sodium donne une nette stabilisation de l'enzyme. La mise en œuvre

d'un procédé en continu est l'un des objectifs majeurs recherché à l'échelle industrielle. Cependant, la stabilité du biocatalyseur immobilisée doit être vérifiée par la technique des batch successifs. Ce essai est alors effectué pour étudier le rendement de décoloration de JD106 et BD77 avec l'enzyme immobilisée régénéré.

Après l'optimisation des paramètres à partir des résultats du tableau(III.3), nous préparons pour chaque colorant, une série de béchers contenant les compositions suivantes :

- 3 ml de solution tampon à pH optimum (pH 2 pour les deux colorants).
- 1 ml de colorant à la concentration optimale correspondante de JD et 1 ml de colorant à la concentration correspondante optimale de BD77.
- 1 ml de peroxyde d'hydrogène à la concentration optimale

Après la mesure de la densité optique initiale, introduire 0 ,5 UI/g de peroxydase sous forme immobilisée dans le mélange réactionnel.

- après le temps optimal, récupérer les billes et centrifuger le mélange, récupérer le surnageant et mesurer sa DO. Les billes récupérées sont injectées pour un autre test de décoloration (un deuxième mélange), laisser un temps optimal, récupérer les billes encore une fois (centrifuger et lire la DO), les mettre dans autre mélange réactionnel pendant un temps optimal récupérer les billes et centrifuger et lire la DO des surnageant jusqu'à ce que le rendement se stabilise.

III.6. Etude de décoloration des colorants JD106 et BD77 par le procédé Fenton

a/ Effet de pH

Dans une série de béchers de 25 ml mettre :

- 6 ml de solution tampon à pH déterminé (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10).
- 2 ml de colorant à une concentration 50 mg/l JD 106 et une concentration 50 mg/l de BD 77.
- 1 ml de peroxyde d'hydrogène de concentration de 8 mM (JD 106) et 40 mM (BD 77).

La réaction est déclenchée par l'introduction de 1 ml de $FeSO_4$ de concentration de 1 mM (JD 106) et 2 mM (BD 77), on laisse la réaction se dérouler 15 min (JD 106) et 15 min (BD 77) puis on l'arrête par la centrifugation des mélanges pendant 10 min avec une vitesse de 3000 tour/min. L'analyse des mélanges avant et après la centrifugation se fait par un spectrophotomètre UV-visible à λ_{max}.

b / Effet de Temps de Contact : Dans une série de béchers de 10 ml mettre :

- 3 ml de solution tampon à pH optimum.

- 1 ml de colorant à une concentration (50 mg/l) de JD 106 et (50 mg/l) de BD 77.
- 1 ml de peroxyde d'hydrogène de concentration de 10 mM (JD 106) et 40 Mm (BD 77).

La réaction est déclenchée par l'introduction de 1 ml de $FeSO_4$ de concentration 1 mM pour JD 106 et 2 mM pour BD 77 on laisse la réaction se dérouler pendant 1,2, 5, 8, 10 et 15 min (JD 106) et 1,2, 5, 8, 10 et 15 min (BD 77) puis on l'arrête par centrifugation les mélanges pendant 10 min avec une vitesse de 3000 tour/min. L'analyse des mélanges avant et après la centrifugation se fait par un spectrophotomètre UV-visible à λ_{max}, correspondant chaque colorant.

c/ Optimisation des concentrations de colorant, de H_2O_2 et de F^{2+} par plans d'experiences

n appliquant la méthode des plans d'expérience, nous avons 3 paramètres qui influent sur le rendement de décoloration (donc 3 *facteurs*) : [colorant], [H_2O_2], [Fe2+], et les niveaux sont fixés à 3 : deux extrêmes et des milieux : alors les essais sont calculés selon $3^3 = 27$ essais 'expériences', les notations suivantes sont intéressantes (Tableau III.4).

Tableau.III.4. Les notions de chaque paramètre pour procédé Fenton.

Essais	***[JD] (mg/l)***	***[H_2O_2] (mM)***	***[Fe^{2+}] (mM)***	***essais***	***[BD] (mg/l)***	***[H_2O_2] (mM)***	***[Fe^{2+}] (mM)***
1	20	0.5	0.2	1	50	5	0.1
2	80	10	2.5	2	135	30	2
3	160	20	5	3	220	60	4

Travaillez avec un mélange réactionnel de 10 ml contant :

- 6 ml de solution tampon à pH2 .
- 2 ml de colorant à la concentration correspondante de JD 106 et 1 ml de colorant à la concentration correspondante de BD 77.
- 2 ml de peroxyde d'hydrogène de concentration.

La réaction est déclenchée par l'introduction de Fe^{2+}, on laisse la réaction se dérouler pendant le temps optimal de chaque colorant, centrifuger les mélanges pendant 10 min avec une vitesse de 3000 tour/min. L'analyse des mélanges avant et après centrifugation se fait par un spectrophotomètre UV-visible à $\lambda_{max.}$

Le tableau (III.5) est le tableau des plans d'expériences pour chaque colorant

Tableau.III.5. Tableau des plans d'expériences pour le JD106 et BD77.

N ° essais	[JD] et [BD] (mg/l)	$[H_2O_2]$ (mM)	$[Fe^{+2}]$ (mM)
1	1	1	1
2	1	1	2
3	1	1	3
4	1	2	1
5	1	2	2
6	1	2	3
7	1	3	1
8	1	3	2
9	1	3	3
10	2	1	1
11	2	1	2
12	2	1	3
13	2	2	1
14	2	2	2
15	2	2	3
16	2	3	1
17	2	3	2
18	2	3	3
19	2	1	1
20	3	1	2
21	3	1	3
22	3	2	1
23	3	2	2
24	3	2	3
25	3	3	1
26	3	3	2
27	3	3	3

III.6. Etude du procédé de couplage : peroxydase immobilisée-fenton

Dans cette partie et après avoir réalisé les expériences précédentes on optimise le couplage simultané enzyme-fenton ;

On réalise l'expérience du couplage simultané des deux procédés comme suit :

On compare la concentration optimale du colorant des deux procédés et on choisir une concentration qui soit en compromis avec les deux procédés, ainsi, on fixe l'AE déjà optimisée par le procédé enzymatique.

En appliquant la méthode des plans d'expériences, nous avons donc 2 paramètres qui influent sur le rendement de décoloration (donc 2 *facteurs*) : $[H_2O_2]$ et $[Fe^{2+}]$, et les niveaux sont fixés à 3 : deux extrêmes et des milieux : alors les essais sont calculés selon $3^2 = 9$ essais 'expériences', les notations suivantes sont intéressantes (Tableau III.6).

Tableau III.6. Les notions des paramètres $[H_2O_2]$ et $[Fe^{+2}]$.

essai	$[H_2O_2]$ (mM)	$[Fe^{+2}]$ (mM)	essai	$[H_2O_2]$ (mM)	$[Fe^{+2}]$ (mM)
1	2,5	0,5	1	2	0,5
2	46,26	2,5	2	51	2,5
3	90	5	3	100	5

Dans une série de bécher de 10 ml on met :

- 6 ml de solution tampon à pH optimal déterminé (à comparer le pH de l'enzyme 2 et celui de fenton);
- 2 ml de colorant de JD 106 et 1 ml de BD 77.
- 2 ml de Fe^{2+}
- Une AE optimale de peroxydase.
- La réaction est déclenchée par addition de 2 ml d'H_2O_2 ;

Laisser la réaction sous agitation de 300 tr/min pendant 30 min, centrifuger le mélange à 3000tr/min pendant 10 min, collecter le surnageant de chaque colorant, mesurer la DO à λ_{max}. Le tableau (III.7) est le tableau des plans d'expériences pour chaque colorant.

Tableau.III.7. Tableau des plans d'expériences pour le JD106 et BD77 pour le couplage.

N°essais	$[H_2O_2]$ (mM]	$[Fe^{+2}]$ (mM)
1	1	1
2	1	2

3	1	3
4	2	1
5	2	2
6	2	3
7	3	1
8	3	2
9	3	3

N.B . Les résultats expérimentaux obtenus dans cette recherche, ont été recommencés plusieurs fois, afin de s'assurer de leur reproductibilité.

IV.RESULTATS ET DISCUSIONS

IV.1.PURIFICATION ET DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUE :

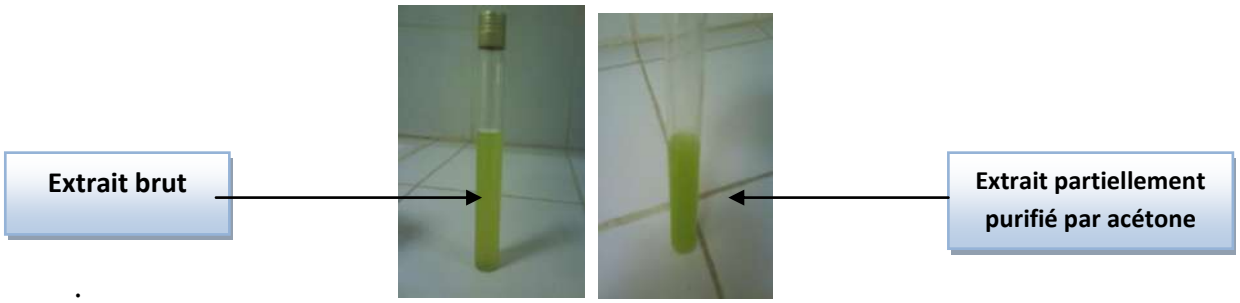
IV.1.1.Effet de la méthode de purification sur l'activité catalytique de la peroxydase :

Après le dosage des activités enzymatiques deux extraits (brute et partiellement purifié par acétone), on a obtenu les résultats suivantes :

Tableau .IV.1.Résultats des activités pour l'EB et l'EEPP.

L'extrait	Activité (UI/ml)	Protéine mg/ml	Activité spécifique (UI/mg)	Rendement (%)	Degré de purification
Brut	1,47	4,61	0,31	100	1
Partiellement purifié par acétone	1,34	1,28	1,04	95,5	2,8

A partir des résultats de ce tableau, nous constatons que les activités catalytiques des extraits sont proches de celles établies pour la peroxydase de (HRP) , [7] ; pour la quantité des protéines, cette dernière est plus élevée dans le cas de l'extrait brut que celui de l'extrait partiellement purifiée, ceci est traduit par les valeurs des activités spécifiques, où celle de l'EEPP est 3 fois plus grande que celle de l'EB. Pour le rendement de purification, qui est maximal pour l'EEPP, par apport l'EB, car ce dernier n'a subit aucune purification. Par conséquent, la purification par précipitation à l'acétone a permis d'éliminer les protéines inactives. L'aspect des deux extraits enzymatiques de la courgette est représenté sur la figure (IV.1)



.

Fig. IV.1. Aspect des deux extraits.

IV.2.Etude de la a décoloration de JD106 et BD 77 par la peroxydase immobilisée

IV.2.1.Caractérisation des billes de peroxydase :

Les billes obtenues, sont sphériques et rigides. Une bille a les propriétés moyennes suivantes :

- Le volume : V m=0 ,0442 cm^3 .
- La masse :$m_m = 0{,}013\ g$.
- La masse volumique :ρ_m=0,294g /cm^3.
- Le diamètre :D_m=2 ,74mm.

IV.2.2.Détermination de l'activité enzymatique des billes :

AE(EEPP)= 1,34 UI /ml

AE(Bille)= 0,82UI/ml

IV.2.3. Essais d'optimisation des paramètres

a/ Effet de pH, l'effet du pH sur le rendement de décoloration des colorants JD106 et BD77 est représentée sur la figure (IV.2).

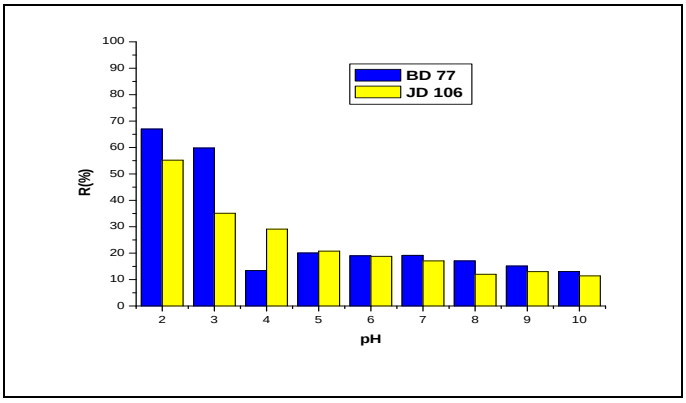


Fig.IV.2. Effet de pH sur le rendement de décoloration de JD 106 et BD 77 par la peroxydase immobilisée.

Discussion des résultats :

La variation du pH de 2 à 10 révèle que la décoloration de JD106 et BD 77 attient son maximum au pH 2 pour JD 106 avec rendement maximale de R_{max} = 55,2% et pour le deuxième colorant BD 77 on a obtenu la même valeur de pH avec un Rmax=67%.

On constate d'après cette courbe que le rendement de décoloration de BD 77 décroit à partir du pH= 3 à 4, puis on observe un légère augmentions à partir pH5, et ensuite une légère diminution de décoloration.

D'autre part, la décoloration de JD 106 est diminue lorsque le pH augmente, on observe que la capacité de décoloration de JD diminue progressivement.

Les courbes montrent que le pH acide était favorable pour la décoloration des deux colorants.

Ce résultat a été déjà reporté par des autres études de décoloration des colorants textiles par les différents types de peroxydase telle que (Arruda Guelli et al,2007) [8], qui ont trouvé que le pH optimale pour éliminer deux colorants industriel par la peroxydase de raifort (HRP) est dans la gamme de 4 à 5. Aussi (Rukhsana Satar et al ,2009) [9], ont utilisé la peroxydase de bitter Groud pour décolorer deux colorant dispersés et le pH optimale trouvé était 3.

Cette valeur optimale de pH 2 sera gardée pour la suite de l'étude.

b/ Effet de Temps de Contact, la figure (IV.3) montre le temps optimal de décoloration des deux colorants par la peroxydase immobilisée.

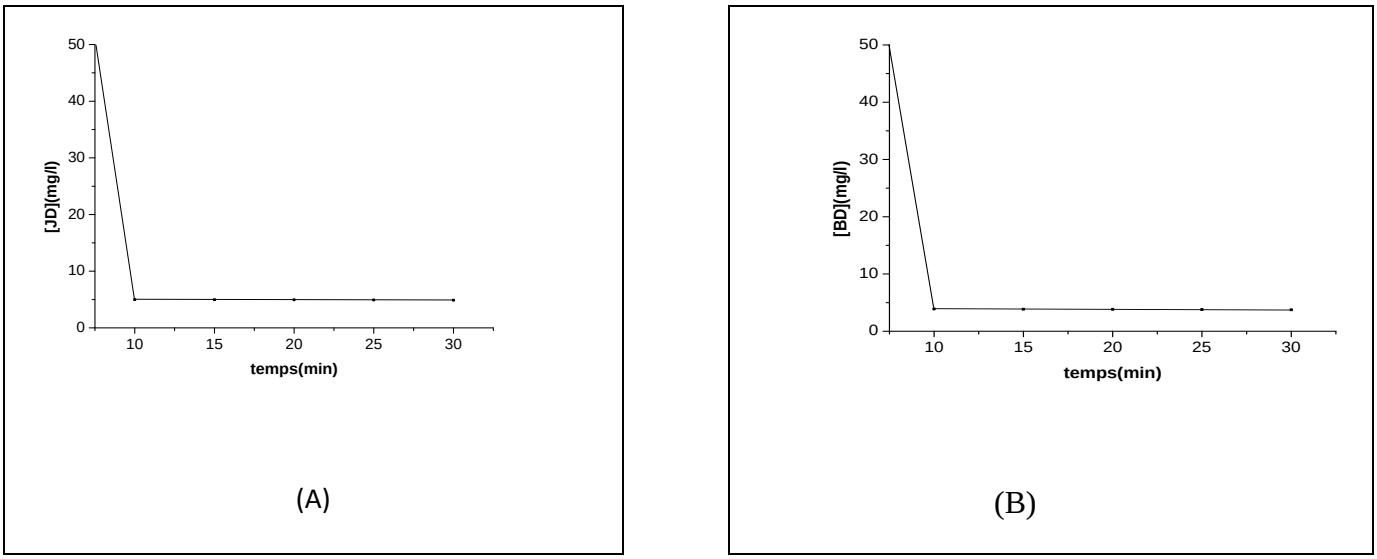


Fig.IV.3. : Cinétique de décoloration : (A) JD 106, (B) DB77, par peroxydase immobilisée.

Discussion des résultats

Les figures (fig. IV.3 .A), (fig. IV.3.B) montrent que les concentrations de JD 106 et BD 77 diminuent progressivement avec l'augmentation de temps de contacts des billes avec les molécules de substrats.

On constate que le temps optimal de décoloration de deux colorants JD106 et BD 77 par la peroxydase immobilisée dans l'alginate est de l'ordre de 10min.

c/ Essais d'optimisation des autres paramètres par plan d'expérience

Dans cette partie de l'étude, nous avons résumé tous les résultats des rendements de décoloration pour les différents essais réalisés sur le tableau(IV.2).

Tableau. IV.2. Tableau des résultats des rendements de différentes concentrations des paramètres :

N° es	[Colorant] (mg/l)	[H_2O_2] (mM)	[AE] (UI /g)	Rendement de décoloration(%) Colorant JD 106	Rendement de décoloration(%) Colorant BD 77
1	1	1	1	8,53	38,54
2	1	1	2	30,22	51,61
3	1	1	3	39,33	44,02
4	1	2	1	8,24	40
5	1	2	2	30 ,80	49,43
6	1	2	3	29,01	**67,84**
7	1	3	1	21,23	12,84
8	1	3	2	17,54	36,51
9	1	3	3	27,05	58
10	2	1	1	15,39	10,28
11	2	1	2	4,15	24,3
12	2	1	3	18,24	28,04
13	2	2	1	4,41	10,81
14	2	2	2	28,74	51,93
15	2	2	3	**40,75**	12,37
16	2	3	1	2,19	33,84
17	2	3	2	16,33	50,80
18	2	3	3	25,27	15,17
19	3	1	1	12,51	2,17
20	3	1	2	31,64	52,19
21	3	1	3	5,13	47,81
22	3	2	1	3,33	32,97
23	3	2	2	8,33	46,83
24	3	2	3	4,76	52,28
25	3	3	1	0,22	43,66
26	3	3	2	0,05	32,28
27	3	3	3	0,05	48,34

D'après ces résultats on constate que le rendement maximal de décoloration de colorant JD 106 est 40,75%, qui correspond aux conditions précises des concentrations des substrats et en enzyme de :

[JD]= 80 mg /l

[H_2O_2]= 90mM

[AE]= 1 UI /g

pour l'autre colorant BD77, nous avons atteint un rendement maximal de 67,84% pour les conditions des concentrations en substrats et en enzyme de :

[BD]= 50 mg/l

$[H_2O_2]$= 100 mM

[AE]= 1 UI/g

Venkata et .al, **[7],** ont étudié la décoloration de l'acide noir 10BX (colorant azoïque), par la peroxydase (HRP) immobilisée dans les billes d'alginate, ces chercheurs ont atteint un rendement maximal de 57% pour un pH2 et un temps de contact 45min, ce qui confirme notre résultat, où le rendement pour le JD106 a une valeur de 41%.

Afin de montrer les effets des trois paramètres ([colorant], $[H_2O_2]$, AE), nous allons calculer les effets de ces paramètres puis les interactions et cela dans le but d'étudier l'influence des paramètres sur la décoloration, lorsque ces dernier varient simultanément.

♦.1. Résultats des effets moyens

On veut déterminer les effets des paramètres ([colorant],$[H_2O_2]$,[AE]),nous calculons les effets de ces paramètres pour chaque niveau

Le tableau (IV.3) récapitule les résultats des effets moyens des paramètres :[colorant] : $[H_2O_2]$ et [AE] sur le rendement de décoloration.

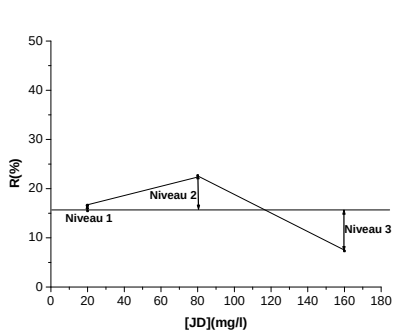
Tableau IV.3. Effets moyens des paramètres ([colorant],$[H_2O_2]$,[AE])

	Effet de [Colorant]			Effet de $[H_2O_2]$			Effet de [AE]		
	$E[colorant]_1$ (mg/l)	$E[colorant]_2$ (mg/l)	$E[colorant]_3$ (mg/l)	$E[H_2O_2]_1$ (mM)	$E[H_2O_2]_2$ (mM)	$E[H_2O_2]_3$ (mM)	$E[AE]_1$ (UI /g)	$E[AE]_2$ (UI /g)	$E[AE]_3$ (UI /g)
JD	1,788	7,157	-8,150	0,460	2,862	-3,271	-7,0361	1,638	5,579
BD	7,463	-10,453	2,99	-3,628	3,648	-0,02	-11,83	4,69	7,14

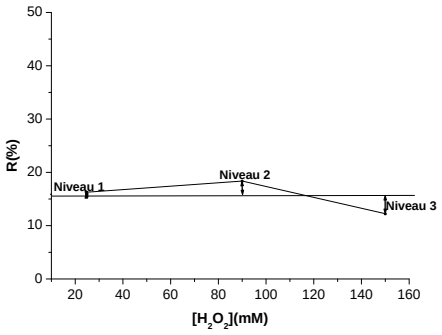
Le rendement moyen général : $R_{moyen(JD)}$=15,48%

$R_{moyen\ (BD)}$=36,84%

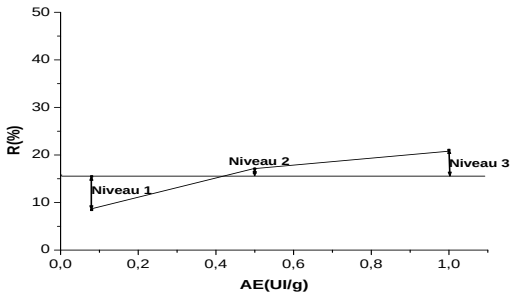
Afin de bien illustrer les effets moyens, nous représentons sur la figure les différents effets calculés.



Effet de [JD]

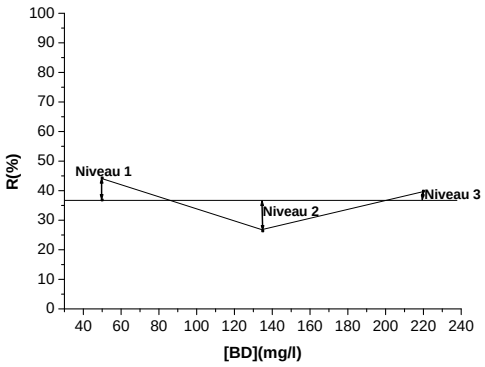


Effet de [H_2O_2]

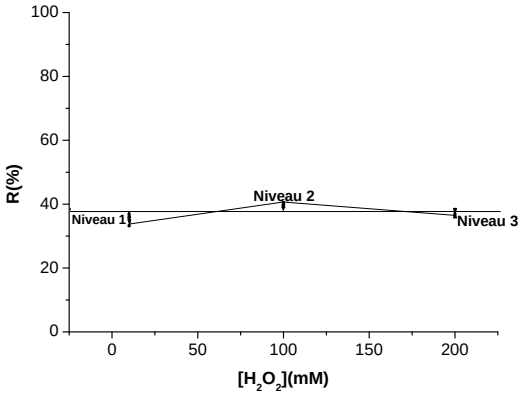


Effet de [AE]

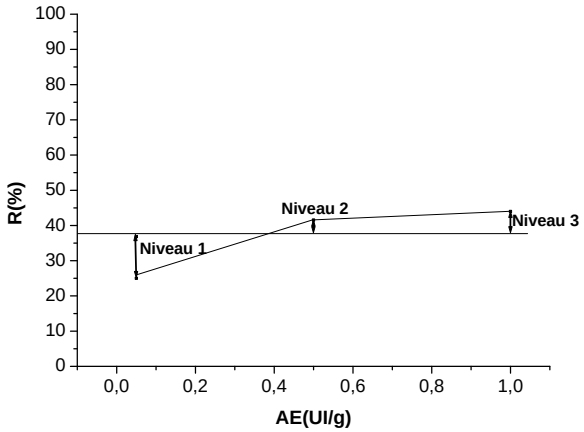
Fig. IV.4. Effets moyens pour JD106



Effet de [BD]



Effet de [H_2O_2]



Effet de [AE]

Fig. IV.5. Effets moyens pour BD77

A partir des figures (IV.4, IV.5), nous avons constaté d'une part que les effets des colorants (JD106 et BD77) et d'AE des billes sont prédominants que l'effet du H_20_2 .

D'autre part, nous avons confirmé le résultat du rendement maximal de décoloration pour les paramètres étudiés aux niveaux correspondants.

♦.2. Résultats des interactions entre les paramètres [colorant], [H_2O_2] et [AE]

Les tableaux récapitulent les résultats de calculs des interactions entre les paramètres ([colorant],[H_2O_2],[AE]).Les figures(IV.6,IV .7) illustre la représentation graphique de ces interactions.

Tableau IV.4. Interaction entre les paramètres [colorant] et [H_2O_2]

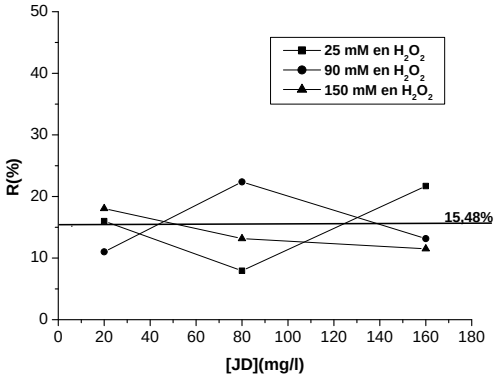
	Paramètre [colorant] / Paramètre [H_2O_2]	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
JD	Niveau 1	IN[H_2O_2]1[JD]1= 0,520%	IN[H_2O_2]1[JD]2= -7,543 %	IN[H_2O_2]1[JD] 3= 6,228%
	Niveau 2	IN [H_2O_2]2[JD]1= -4,478%	IN[H_2O_2]2[JD]2= 6,898%	IN[H_2O_2]2[JD]3= -2,322 %
	Niveau 3	IN[H_2O_2]3[JD]1= 2,567%	IN[H_2O_2]3[JD]2= 0,593%	IN[H_2O_2]3[JD]3= - 3,975%
BD	Niveau 1	IN[H_2O_2]1[BD]1= 4,04 %	IN[H_2O_2]1[BD]2= -1,89 %	IN[H_2O_2]1[BD]3= -2,15 %
	Niveau 2	IN[H_2O_2]2[BD]1= 4,46%	IN[H_2O_2]2[BD]2= -5,00 %	IN [H_2O_2]2[BD]3= 0,54 %
	Niveau 3	IN[H_2O_2]3[BD]1= -8,50 %	IN[H_2O_2]3[BD]2= 6,89 %	IN[H_2O_2]3[BD]3= 1,61 %

Tableau IV.5. interaction entre les paramètres [colorant] et [AE]

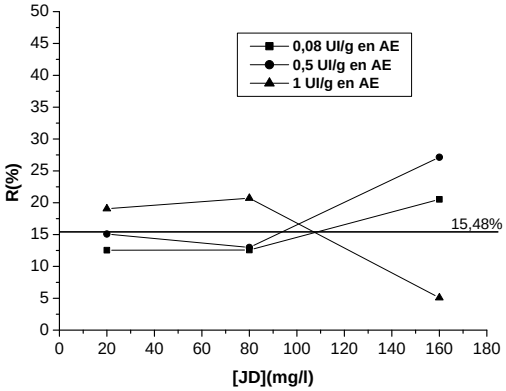
	Paramètre [colorant] / Paramètre [AE]	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
JD106	Niveau 1	IN[AE]1[JD]1= -2,940 %	IN[AE]1[JD]2= -2,908 %	IN[AE]1[JD] 3= 5 ,053 %
	Niveau 2	IN[AE]2[JD]1= - 0,402%	IN[AE]2[JD]2= -2,506%	IN[AE]2[JD]3= -3,1%
	Niveau 3	IN[AE]3[JD]1= 3,573 %	IN[AE]3[JD]2= 5,232%	IN[AE]3[JD]3= -9,601 %
BD77	Niveau 1	IN[AE]1[BD]1= -2,01 %	IN[AE]1[BD]2= 3,751%	IN[AE]1[BD]3= -1,73 %
	Niveau 2	IN[AE]2[BD]1=- 5,6%	IN[AE]2[BD]2= 8,81 %	IN[AE]2[BD]3= -1,61 %
	Niveau 3	IN[AE]3[BD]1=7,615 %	IN[AE]3[BD]2= -12,56 %	IN[AE]3[BD]3= 4,94 %

Tableau IV.6 .interaction entre les paramètres [H_2O_2] et [AE]

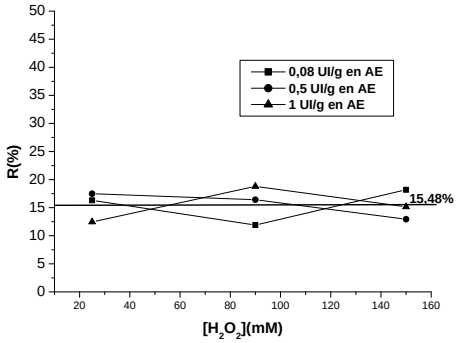
	Paramètre [H_2O_2] / Paramètre [AE]	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
JD	Niveau 1	IN[AE]1[H_2O_2]1= 0,830%	IN[AE]1[H_2O_2]2= -3,583%	IN[AE]1[H_2O_2] 3= 2,701%
	Niveau 2	IN[AE]2[H_2O_2]1= 2,015 %	IN[AE]2[H_2O_2]2= 0,949%	IN[AE]2[H_2O_2]3= -2,546%
	Niveau 3	IN[AE]3[H_2O_2]1= -3,028%	IN[AE]3[H_2O_2]2= 3,314%	IN[AE]3[H_2O_2]3= -0,337 %
BD	Niveau 1	IN [AE]1[H_2O_2]1 = -4,38%	IN[AE]1[H_2O_2]2= -0,73 %	IN[AE]1[H_2O_2]3= **5,12 %**
	Niveau 2	IN[AE]2[H_2O_2]1= 2,34 %	IN[AE]2[H_2O_2]2= 1,76 %	IN[AE]2[H_2O_2]3= -4,10 %
	Niveau 3	IN[AE]3[H_2O_2]1= 2,04%	IN[AE]3[H_2O_2]2= -1,02 %	IN[AE]3[H_2O_2]3= -1,01%



Interaction [JD]/ [H_2O_2]



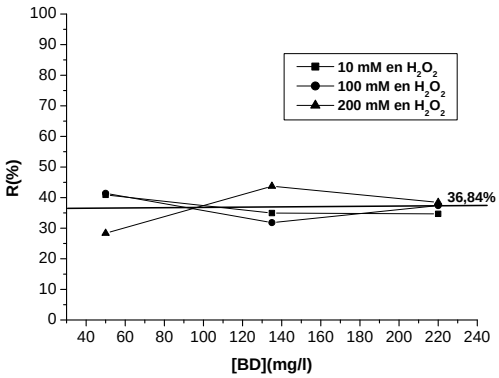
Interaction [JD]/ [AE]



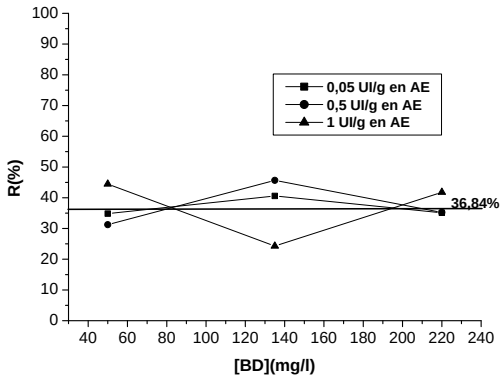
Interaction [H_2O_2]/ [AE]

Fig.IV.6. Interactions entre les paramètres ([JD],[H_2O_2],[AE]) pour JD106.

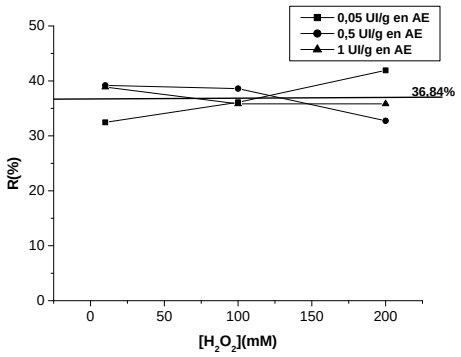
*



Interaction [BD]/ [H_2O_2]



Interaction [BD]/ [AE]



Interaction [H_2O_2]/ [AE]

Fig.IV.7. Interactions entre les paramètres ([JD],[H_2O_2],[AE]) pour BD77.

Pour déduire la configuration optimale donnant le rendement maximale, il faut tenir compte aussi des interactions qui lient les trois paramètres entre eux.

La solution est déduite des graphes des interactions ([colorant]/[[H_2O_2] ,[colorant]/[AE],[H2O2]/[AE]) ,la configuration optimale est celle qui correspondant à la rendement maximales des différentes configurations

D'après ces graphes, la solution recherche correspond à la configuration suivante :

Paramètre [JD] au niveau 2

Paramètre [H_2O_2] au niveau 2

Paramètre [AE] au niveau 3

C'est-à-dire :

[JD]=80 mg/l

[H_2O_2]=90mM

[AE]=1UI /g

Pour le deuxième colorant BD77, solution recherche correspond à la configuration suivante :

Paramètre [BD] au niveau 2

Paramètre [H_2O_2] au niveau 3

Paramètre [AE] au niveau 2

C'est-à-dire :

[BD]= 135 mg/l

[H_2O_2]= 200 mM

[AE]= 0,5 UI /g

Avec un rendement de 50,80%

L'interactions entre [JD]/[AE] sont prépondérant par apport interaction entre JD/H_2O_2 et AE/H_2O_2.

d / Elaboration du modèle

Après avoir étudié les effets moyens des différents coefficients (calculés individuellement) et les interactions en terme de combinaisons « deux paramètres à deux », nous allons essayer d'établir un modèle type équation (4). La détermination des coefficients de ce modèle est basée sur une méthode standard [10]. Par conséquent nous sommes arrivés à établir les équations suivantes décrivant la dégradation des colorants JD 106 et BD77 respectivement:

$Y = 15,48-9,77X_1-2,11X_2+ 3,63 X_3-2,22X_1X_2-5,52 X_1X_3-2,22 X_2X_3+5,02X_1X_2X_3$……(5)

$Y= 36,84-1,42X_1+3,78X_2+ 12,62X_3+6,71X_1X_2-0,04 X_1X_3-0,16 X_2X_3-10,98X_1X_2X_3$…...(6)

Avec :

X_1 : variable réduite exprimant la concentration du colorant

X_2 : variable réduite exprimant la concentration du H_2O_2

X_3 : variable réduite exprimant l'AE

Y : rendement de décoloration

Afin d'établir l'équation finale de la réponse, on doit étudier statistiquement la significativité des coefficients affectés aux différents paramètres . Pour cela, on utilise le test de Student pour un intervalle de confiance choisi (5% par exemple) et pour le nombre de degrés de liberté basé sur la reproductibilité des résultats (n-1=2) [10]. Dans ce cas nous avons calculé les paramètres t_j (voir tableau IV.7). Ainsi, les facteurs de Student calculés pour le JD106 et le BD77 ont les valeurs : 1,55 et 1,63 respectivement. La comparaison de t_j calculés avec les

tables statistiques de Student, (pour une valeur estimée de t_j = 2,36), nous a permis de réduire certains coefficients comme indiqué sur le tableau(IV.7).

Par conséquent, les expressions des modèles (équations 5 et 6) se réduisent sous forme pour JD106 et BD77 respectivement :

$Y = 15{,}48 + 6{,}3X_1 + 2{,}34X_3 + 3{,}54X_1X_3 + 3{,}23X_1X_2X_3$

$Y = 36{,}81 + 2{,}32X_2 + 7{,}74X_3 + 4{,}11X_1X_2 + 6{,}18X_1X_2X_3$

Les résultats de calcul des nouvelles valeurs de rendement de décoloration pour les deux colorants est donnée sur le tableau(IV.7).

Tableau.IV.7. Résultats de calcul des nouvelles valeurs de rendement de décoloration pour les deux colorants.

JD 106				***Essais***	BD77			
t_j		R(%) calculé	R(%) expr		t_j		R(%) calculé	R(%) expr
t_1	6,3	8,75	8,53	***1***	t_1	0 ,87	38,85	38,54
t_2	1,36	14,73	12,51	***2***	t_2	2,32	2,12	2,17
t_3	2,34	23,45	21,23	***3***	t_3	7,74	12,83	12,84
t_{12}	1,43	0,47	0,22	***4***	t_{12}	4,11	43,57	43,66
t_{13}	3,54	41,53	39,33	***5***	t_{13}	0,024	13,93	44,02
t_{23}	1,43	5,35	5,13	***6***	t_{23}	0,1	47,75	47,81
t_{123}	3,23	27,27	27,05	***7***	t_{123}	6,18	57,91	58
		2,29	0,05	***8***			48,25	48,34

IV.2.4.Batch successifs :

Résultats :

Les rendements de décoloration de JD et BMB obtenus après chaque batch sont présentés sur figure :

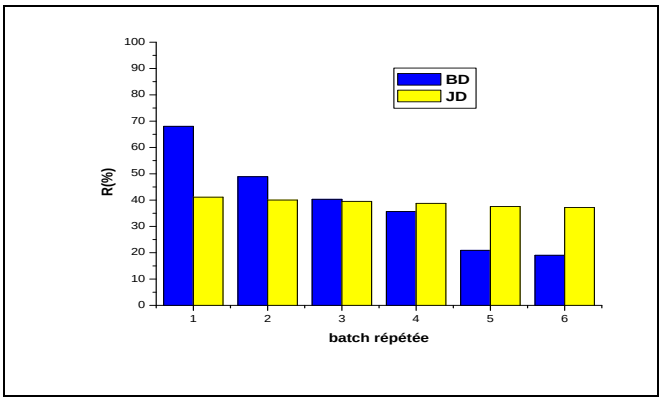


Fig. IV.8.Décoloration en système batch des deux colorants JD106 et BD 77.

Après l'analyse précise de ces histogrammes, en trouve que pour le BD 77, on démarre avec un rendement de 68,03%, et on atteint de 37% de décoloration après le quatrième batch . un résultat différent était constaté pour le JD 106 ou le rendement après le première batch était 41,09% puis il diminue légèrement jusqu'à le sixième batch, où il atteint une valeur de 39%.

Les résultats obtenus montrent que les contraintes de diffusion sont à des degrés divers après chaque batch .Cela se produit parce que les pores de l'alginate de sodium sont graduellement chargés par les colorants, ce qui limite la diffusion des molécules des colorants à l'intérieur des billes. Par ailleurs, une perte partielle de la peroxydase immobilisée suite a la manipulation et au lavage peut avoir un impact sur le rendement. Ven kata et.al ; [7] ont étudié la décoloration du colorant azoïque noir acide 10BX par plusieurs cycles de peroxydase immobilisées, ils ont montré que à partir du premier Batch, les billes d'alginates chargées de peroxydase perdent leurs capacité de décoloration. La différence de résultat, peut être due les conditions d'optimisation d'immobilisation de peroxydase et même la source végétale d'enzyme.

IV.3. Etude de décoloration des colorants JD106 et BD77 par le procédé Fenton

a/ Effet de pH, la figure (IV.9) illustre l'effet du pH sur la décoloration des JD106 et BD77.

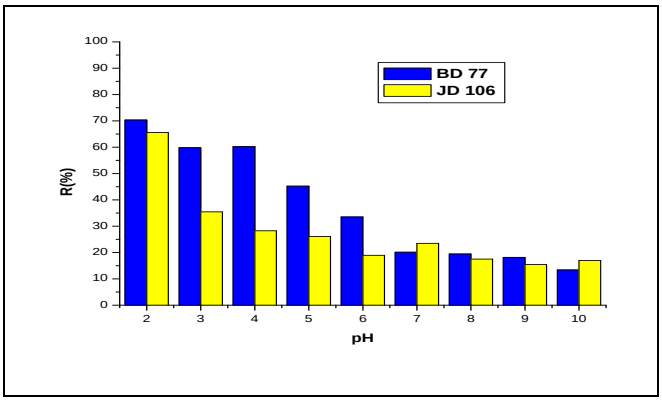


Fig.IV.9. Effet de pH sur le rendement de décoloration de JD 106 par procédé Fenton.

Discussion des résultats :

Le pH de la solution constitue un paramètre important pour le processus d'oxydation par le procédé Fenton, il contrôle le taux de production de radicaux hydroxyles et la concentration de Fe^{+2}. Il est également une variable opérationnelle importante.

La variation du pH de 2 à 10 révèle que la décoloration de JD106 et BD 77 attient son maximum au pH 2 pour JD 106 où on a un rendement maximal de R_{max} = 67,6% et pour le deuxième colorant BD 77 on a obtenu un R_{max}=70,32%, pour la même valeur de pH2.

Selon les allures établies, lorsque la valeur du pH est supérieure à 2 dans cette réaction, la capacité d'oxydation Fenton est diminuée en raison de la décomposition du peroxyde d'hydrogène et la désactivation de catalyseur ferreux avec la formation de complexe hydroxyle de fer. Par conséquent, le processus Fenton est sensible aux la valeur du pH .

La dégradation des deux colorants azoïques B54 et R31 ; [9] (même famille que JD) en fonction du pH indiquent clairement que l'ampleur de la dégradation diminue avec l'augmentation de la valeur de pH= 3. Cela démontre le pH le plus efficace pour la dégradation de B54 et R31 par le réactif de Fenton est 3.

b/ Effet de Temps de Contact, pour optimiser le temps de contact nécessaire pour la décoloration des colorants JD106 et BD77, nous représentons sur la figure(IV.13) le rendement de décoloration en fonction du temps.

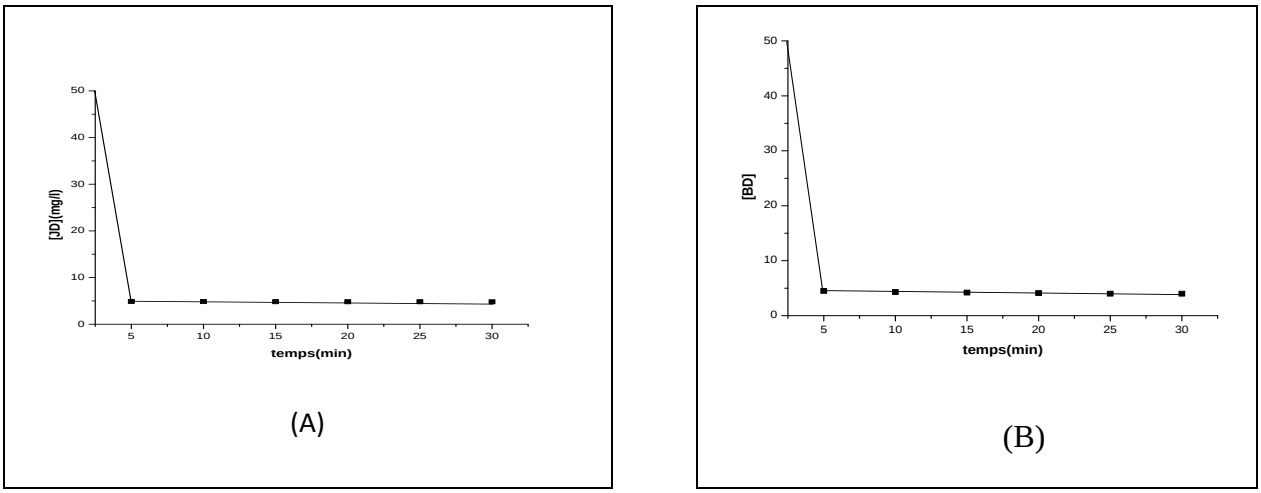


Fig.IV.10. Cinétique de décoloration : (A) JD 106, (B) DB77, par procédé Fenton.

Discussion des résultats

Le Figure (IV.10) fournit des données sur la cinétique de décoloration pour JD 106 et BD 77. La décoloration d'ensemble peut être divisée en deux étapes. Initialement, il a été constaté que JD 106 et BD 77 n'ont pas été décomposée complètement dans la durée de 5 min, ce n'est que le peroxyde d'hydrogène et les ions ferreux sont ajoutés et réagir pour initier la chaine réactionnelle des réactions fenton. Par conséquent, il peut être confirmé que JD 106 et BD 77 sont significativement oxydé par Le réactif de Fenton au de la de 5ème minute. Ainsi, le

taux de décoloration a partir de la cinquième minute de réaction a été beaucoup plus rapide qu'après cette période. Près de 70% de décoloration se produit dans la cinquième minute pour les deux colorants. Reste la réaction se produit lentement ou fixé.

Les ions ferriques produits dans la première étape peuvent réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour produire des radicaux hydroperoxyles (HO^{2+}) et d'ions ferreux. Les ions ferreux reproduits réagissent avec le peroxyde d'hydrogène pour produire des radicaux hydroxyles. Les radicaux hydroxyles et les radicaux hydroperoxyles ainsi formés sont capables de continuer décomposition du colorant. Le radical hydroperoxyles a une capacité d'oxydation plus faible que l'OH^+ [9].

c/Optimisation des concentrations de colorant, de peroxydase et de catalyseur par le procédé Fenton, en utilisant les plans d'expériences

Dans cette partie d'étude, nous avons résumé tous les résultats établis pour les trois niveaux des trois paramètres sur le tableau(IV.8).

Tableau.IV.8.Résultats des rendements des trois paramètres au trois niveau.

N° essais	**[Colorant] (mg/l)**	**[H_2O_2] (mM)**	**[Fe^{+2}] (Mm)**	**Rendement de décoloration de JD106(%)**	**Rendement de décoloration de BD77(%)**
1	1	1	1	20,60	62,80
2	1	1	2	58,6	**96,30**
3	1	1	3	26,5	95,70
4	1	2	1	8,5	36,32
5	1	2	2	53,09	6,35
6	1	2	3	51,4	67,42
7	1	3	1	81,35	41,13
8	1	3	2	63,47	82,60
9	1	3	3	54,90	56,61
10	2	1	1	84,23	29,01
11	2	1	2	85,03	90,12
12	2	1	3	87,70	86,24
13	2	2	1	30,40	22,80
14	2	2	2	69,63	82,35
15	2	2	3	68,21	84,50
16	2	3	1	89,90	16,28
17	2	3	2	**89,91**	86,19
18	2	3	3	78,90	79,46
19	3	1	1	1,01	26,51
20	3	1	2	1,03	95,8
21	3	1	3	2,00	95,3
22	3	2	1	2,19	26,61
23	3	2	2	59,6	95,20

24	3	2	3	64,31	94,98
25	3	3	1	1,31	14,02
26	3	3	2	82,65	58,68
27	3	3	3	80,7	93,97

D'après ces résultats on constate que le rendement maximal de décoloration de colorant JD 106 est 89,91% , et cela pour des conditions précises des concentrations des paramètres :

[JD]= 80 mg /l

$[H_2O_2]$= 20 mM

$[Fe^{+2}]$= 2, 5 mM

En ce qui concerne le deuxième colorant BD 77, nous avons attient un rendement de 96,30% pour les conditions des paramètres :

[BD]= 50 mg/l

$[H_2O_2]$= 5 mM

$[Fe^{+2}]$= 2 mM

De même comme déjà fait pour le traitement enzymatique, nous avons calculés les effets moyens et les interactions entre les paramètres pour les différents niveaux.

♦.1. Résultats des effets moyens

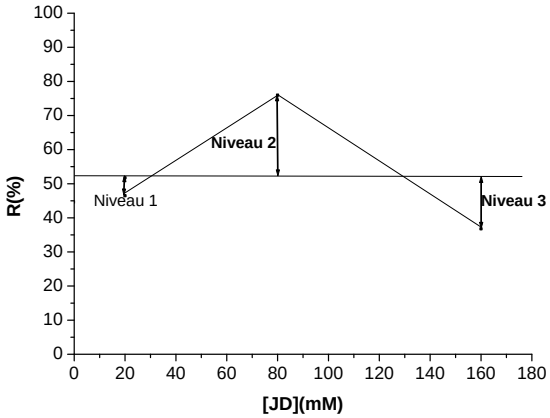
Le tableau (IV.9) récapitule les résultats des effets moyens des paramètres :[colorant], $[H_2O_2]$ et $[Fe^{+2}]$ sur le rendement de décoloration, la figure (IV.11,IV.13) représente graphiquement ces effets :

Tableau (IV .9) : Effets moyens des paramètres [colorant],$[H_2O_2]$,$[Fe^{+2}]$ pour JD106

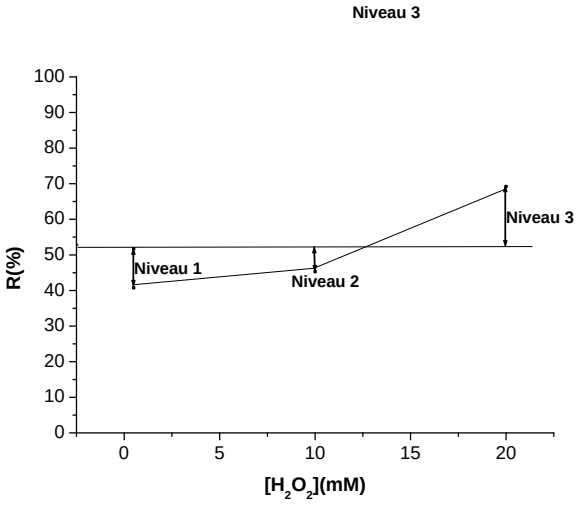
	Effet de [JD]			Effet de [H2O2]			Effet de $[Fe^{+2}]$		
	$E[colorant]_1$ (mg/l)	$E[colorant]_2$ (mg/l)	$E[colorant]_3$ (mg/l)	$E[H_2O_2]_1$ (mM)	$E[H_2O_2]_2$ (mM)	$E[H_2O_2]_3$ (mM)	$E[Fe^{+2}]_1$ (mM)	$E[Fe^{+2}]_2$ (mM)	$E[Fe^{+2}]_3$ (mM)
JD	-5,25	24,24	-18,98	-11,00	-6,48	17,48	-16,24	10,81	5,43
BD	3,24	0,28	2,96	11,48	-6,43	-5,05	-33,21	19,97	13,24

Le rendement moyen général :$R_{moyen(JD)}$=51,74

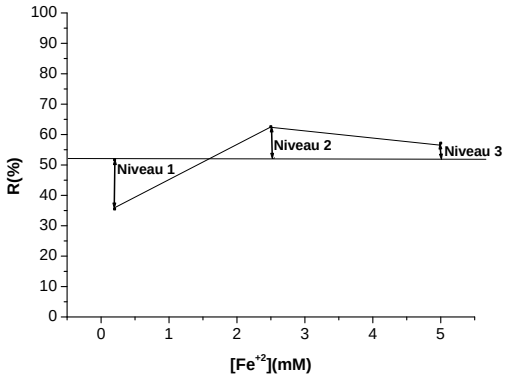
Le rendement moyen général $R_{moyen\ (BD)}$=63,82 %



Effet de [JD]

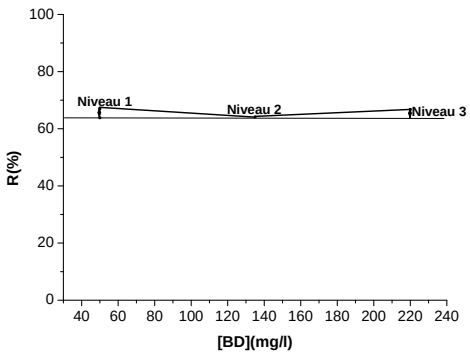


Effet de $[H_2O_2]$

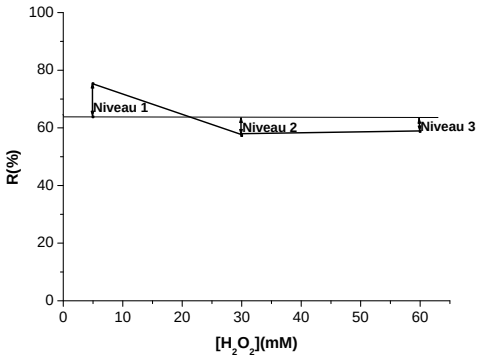


Effet de $[Fe^{+2}]$

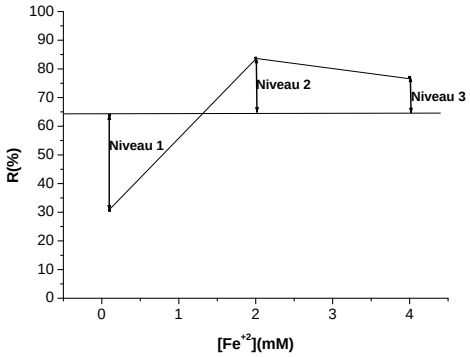
Fig. IV.11. Effets moyens pour JD106.



Effet de [BD]



Effet de [H_2O_2]



Effet de [Fe^{+2}]

Fig. IV.12. Effets moyens pour BD77.

A partir des figures (IV.11, IV.12), nous avons constaté d'une part que les effets des colorants (JD106 et BD77) et de Fe^{+2} sont prédominants que l'effet du H_20_2 .

D'autre part, nous avons confirmé le résultat du rendement maximal de décoloration pour les paramètres étudiés aux niveaux correspondants.

♦.2. Résultats des interactions entre les paramètres [colorant], [H_2O_2] et [Fe^{+2}]

Les tableaux récapitulent les résultats de calculs des interactions entre les paramètres ([colorant], [H_2O_2], [Fe^{+2}]).Les figures (IV.13,IV.14) illustre la représentation graphique de ces interactions.

Tableau.IV.10 . Interaction entre les paramètres [colorant] et [H_2O_2]

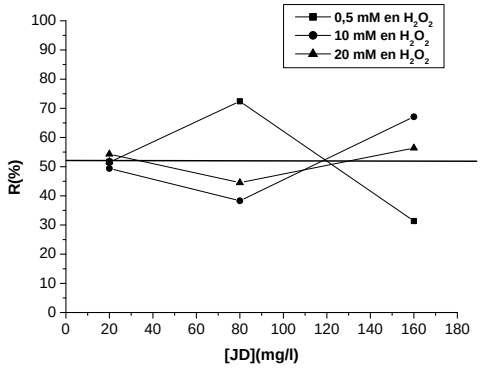
	Paramètre [colorant] / Paramètre [H_2O_2]	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
JD	Niveau 1	IN[H_2O_2]1[JD]1= -0,25	IN[H_2O_2]1[JD]2= 20,66	IN[H_2O_2]1[JD] 3= -20,40
	Niveau 2	IN [H_2O_2]2[JD]1= -2,34	IN[H_2O_2]2[JD]2= -13,42	IN[H_2O_2]2[JD]3= 15,76
	Niveau 3	IN[H_2O_2]3[JD]1= 2,59	IN[H_2O_2]3[JD]2= -7,24	IN[H_2O_2]3[JD]3= 4,64
BD	Niveau 1	IN[H_2O_2]1[BD]1= 12,86	IN[H_2O_2]1[BD]2= 4,35	IN[H_2O_2]1[BD]3= -5,73
	Niveau 2	IN[H_2O_2]2[BD]1= -17,45	IN[H_2O_2]2[BD]2= 5,54	IN [H_2O_2]2[BD]3= 11,90
	Niveau 3	IN[H_2O_2]3[BD]1= 4,58	IN[H_2O_2]3[BD]2=1,59	IN[H_2O_2]3[BD]3= -6,17

Tableau .IV.11 . Interaction entre les paramètres [colorant] et [Fe^{+2}]

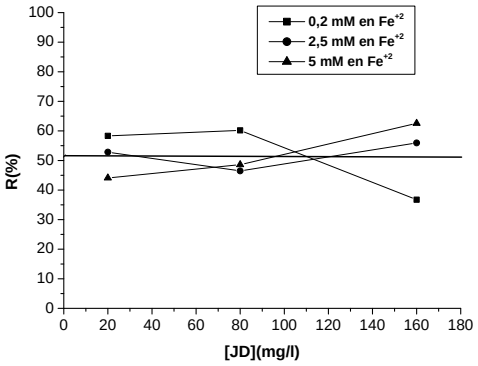
	Paramètre [colorant] / Paramètre [Fe^{+2}]	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
JD	Niveau 1	IN[Fe^{+2}]1[JD]1= 6,57	IN[Fe^{+2}]1[JD]2= 8,43	IN[Fe^{+2}]1[JD] 3= -15,00
	Niveau 2	IN[Fe^{+2}]2[JD]1= 1,08	IN[Fe^{+2}]2[JD]2= -5,27	IN[Fe^{+2}]2[JD]3= 4,19
	Niveau 3	IN[Fe^{+2}]3[JD]1= -7,65	IN[Fe^{+2}]3[JD]2= -3,15	IN[Fe^{+2}]3[JD]3= 10,81
BD	Niveau 1	IN[Fe^{+2}]1[BD]1= 9,45	IN[Fe^{+2}]1[BD]2= -8,19	IN[Fe^{+2}]1[BD]3= -11,19
	Niveau 2	IN[Fe^{+2}]2[BD]1= -12,07	IN[Fe^{+2}]2[BD]2= 8,87	IN[Fe^{+2}]2[BD]3= 3,19
	Niveau 3	IN[Fe^{+2}]3[BD]1=7,31	IN[Fe^{+2}]3[BD]2= -0,67	IN[Fe^{+2}]3[BD]3= 7,99

Tableau.IV.12. Interaction entre les paramètres [H_2O_2] et [Fe^{+2}]

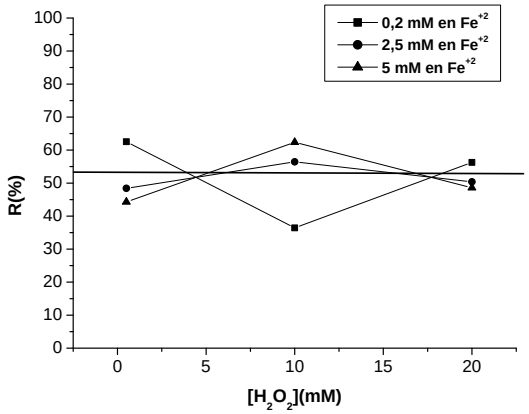
	Paramètre [H_2O_2] / Paramètre [Fe^{+2}]	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
JD	Niveau 1	IN[Fe^{+2}]1[H_2O_2]1= 10,78	IN[Fe^{+2}]1[H_2O_2]= -15,31	IN[Fe^{+2}]1[H_2O_2] 3= 4,53
	Niveau 2	IN[Fe^{+2}]2[H_2O_2]1= -3,33	IN[Fe^{+2}]2[H_2O_2]2= 4,70	IN[Fe^{+2}]2[H_2O_2]3= -1,36
	Niveau 3	IN[Fe^{+2}]3[H_2O_2]1= -7,44	IN[Fe^{+2}]3[H_2O_2]2= 10,61	IN[Fe^{+2}]3[H_2O_2]3= -3,15
BD	Niveau 1	IN[Fe^{+2}]1[H_2O_2]1= -2,65	IN[Fe^{+2}]1[H2O2]2= 4,39	IN[Fe^{+2}]1[H_2O_2]3= -1,74
	Niveau 2	IN[Fe^{+2}]2[H_2O_2]1= 5,52	IN[Fe^{+2}]2[H_2O_2]2= - 9,33	IN[Fe^{+2}]2[H_2O_2]3= 3,81
	Niveau 3	IN[Fe^{+2}]3[H_2O_2]1= -2,86	IN[Fe^{+2}]3[H_2O_2]2= 4,93	IN[Fe^{+2}]3[H_2O_2]3= -2,06



Interaction [JD]/ [H_2O_2]

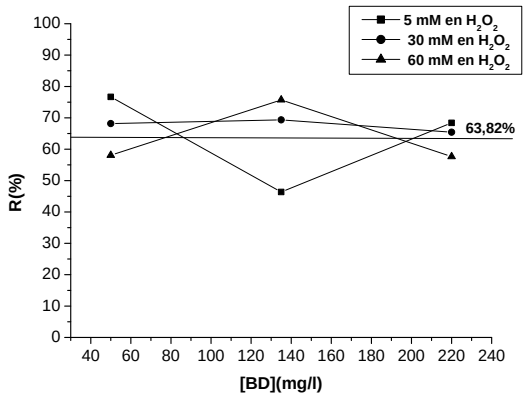


Interaction [JD]/ [Fe^{+2}]

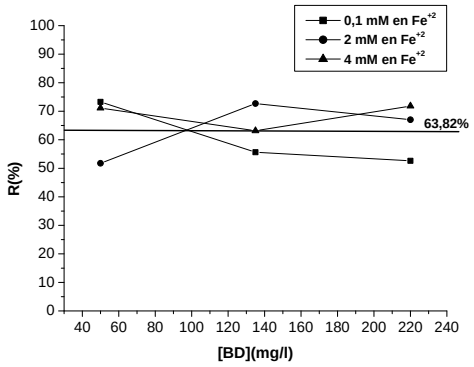


Interaction [H_2O_2]/ [Fe^{+2}]

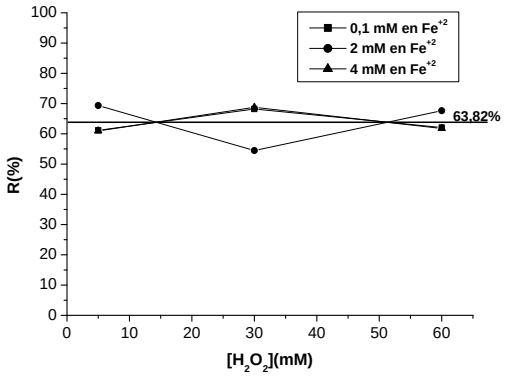
Fig.IV.13. Interactions entre les paramètres ([JD],[H_2O_2],[Fe^{+2}]) pour JD106.



Interaction [BD]/ $[H_2O_2]$



Interaction [BD]/ $[Fe^{+2}]$



Interaction $[H_2O_2]/[Fe^{+2}]$

Fig.IV.14. Interactions entre les paramètres ([BD],$[H_2O_2]$,$[Fe^{+2}]$) pour BD77.

Pour déduire la configuration optimale donnant le rendement maximale, il faut tenir compte aussi des interactions qui lient les trois paramètres entre eux.

La solution est déduite des graphes des interactions ([colorant]/[$[H_2O_2]$,[colorant]/$[Fe^{+2}]$,$[H_2O_2]/[Fe^{+2}]$) ,la configuration optimale est celle qui correspondant à la rendement maximale des différentes configurations

D'après ces graphes, la solution recherche correspond à la configuration suivante :

Paramètre [JD] au niveau 2

Paramètre $[H_2O_2]$ au niveau 1

Paramètre $[Fe^{+2}]$ au niveau 3

C'est-à-dire :

[JD]=80mg/l

$[H_2O_2]$=0,5mM

$[Fe^{+2}]$=5Mm

Avec un rendement de 87,70% Presque que le rendement maximal.

Pour le colorant BD77, la solution recherche correspond à la configuration suivante :

Paramètre [BD] au niveau 1

Paramètre $[H_2O_2]$ au niveau1

Paramètre $[Fe^{+2}]$ au niveau 2

C'est-à-dire :

[BD]= 50mg/l

$[H_2O_2]$= 5mM

$[Fe^{+2}]$= 2mM

d- Elaboration du modèle

Après avoir étudié les effets moyens des différents coefficients (calculés individuellement) et les interactions en terme de combinaisons « deux paramètres à deux », nous allons essayer d'établir un modèle type équation (4). La détermination des coefficients de ce modèle est basée sur une méthode standard [10]. Par conséquent nous sommes arrivés à établir les équations suivantes décrivant la décoloration des colorants JD 106 et BD77 respectivement :

$Y = 33,54-12,29X_1+21,01X_2+ 7,47\ X_3-1,26X_1X_2+12,61\ X_1X_3+5,75\ X_2X_3+13,48X_1X_2X_3\ldots(7)$

$Y= 60,75-3,3X_1-9,32X_2+ 24,64X_3+5,86X_1X_2+12,54X_1X_3-0,78\ X_2X_3+3,57X_1X_2X_3\ldots..(8)$

Avec :

X_1 : variable réduite exprimant la concentration du colorant

X_2 : variable réduite exprimant la concentration du H_2O_2

X_3 : variable réduite exprimant du Fe^{+2}

Y : rendement de décoloration

Afin d'établir l'équation finale de la réponse, on doit étudier statistiquement la significativité des coefficients affectés aux différents paramètres . Pour cela, on utilise le test de Student pour un intervalle de confiance choisi (5% par exemple) et pour le nombre de degrés de liberté basé sur la reproductibilité des résultats (n-1=2) [10]. Dans ce cas nous avons calculé les paramètres t_j (voir tableau.IV.13). Ainsi, les facteurs de Student calculés pour le JD106 et le BD77 ont les valeurs : 5,69 et 1,74 respectivement. La comparaison de t_j calculés avec les tables statistiques de Student, (pour une valeur estimée de t_j = 2,36), nous a permis de réduire certains coefficients comme indiqué sur le tableau(IV.13).

Par conséquent, les expressions des modèles (équations 7 et 8) se réduisent sous forme respectivement :

$Y = 33,54+3,69X_2+2,43X_1X_2X_3$

$Y = 60,75+5,35\ X_2+14,16\ X_3+3,34X_1X_2+7,20X_1X_3$

Les résultats de calcul des nouvelles valeurs de rendement de décoloration pour les deux colorants est donnée sur le tableau(IV.13).

Tableau.IV.13. Résultats de calcul des nouvelles valeurs de rendement de décoloration pour les deux colorants.

JD 106				***Essais***	BD77			
t_j		R(%) calculé	R(%) expr		t_j		R(%) calculé	R(%) expr
t_1	2,15	23,13	20,6	***1***	t_1	1,89	65,85	62,80
t_2	3,69	0,65	1,01	***2***	t_2	5,35	36,19	26,51
t_3	1,31	81,33	81,35	***3***	T_3	14,16	44,19	41,13
T_{12}	0,22	1,33	1,31	***4***	T_{12}	3,34	17,04	14,02
T_{13}	2,21	26,51	26,5	***5***	t_{13}	7,20	98,75	95,7
T_{23}	1,01	2,35	2	***6***	T_{23}	0,44	98,3	95,3
T_{123}	2,43	54,87	54,9	***7***	T_{123}	2,05	59,68	56,61
		80,3	80,7	***8***			97,03	93,97

IV.4. Etude du procédé de couplage : peroxydase immobilisée-fenton,

D'après les résultats des études des traitements enzymatiques et fenton séparément sur les rendements de décoloration, nous avons fixé la concentration des colorants JD106 et BD77 respectivement en 80mg/l et 50 mg/l, et pour une activité enzymatique de 1 UI/g. pour ces conditions, nous tentons alors d'optimiser les concentrations en H_2O_2 et en Fe^{2+} seulement. Par conséquent, notre plan factoriel est construit de 2 paramètres à trois niveau, nous aurons alors

3^3 = 9essais.

Les différents résultats établis après l'étude de couplage des procédés Peroxydase immobilisée-Fenton sont résumés sur le tableau(IV.14)

Etude du procédé de couplage : peroxydase-fenton :

Tableau (IV .14) . Tableau des différents résultats des rendements de couplage.

N° essais	**[H_2O_2] (mM)**	**[Fe^{2+}] (mM)**	**Rdt de décoloration de JD106(%)**	**Rdt de décoloration de BD77(%)**
1	1	1	92,11	49,14
2	1	2	90 ,15	98,29
3	1	3	51,09	98,90
4	2	1	83,61	83,61
5	2	2	85,83	98,29

6	2	3	81,11	**98,97**
7	3	1	**93,38**	47,5
8	3	2	92,07	92,42
9	3	3	80,08	94,42

L'analyse des résultats de ce tableau montre bien que le rendement de décoloration a amélioré, par comparaison avec le traitement enzymatique seul ou chimique seul. Ce qui indique l'avantage du couplage sur la décoloration des colorants étudiés. Pour bien illustrer les effets des deux paramètres, nous calculons de la même manière les effets moyens et les interactions entre ces paramètres. Le tableau (IV.13) donne les différents résultats établis.

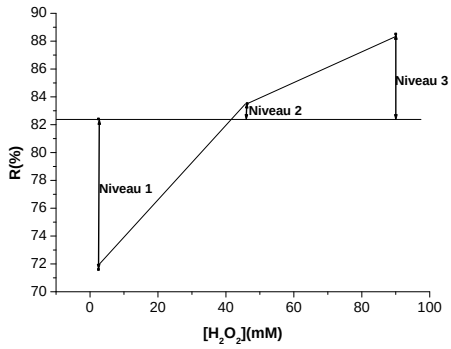
♦.1. Résultats des effets moyens

Tableau .IV.15. Effets moyens des paramètres [H_2O_2] et [Fe^{+2}]

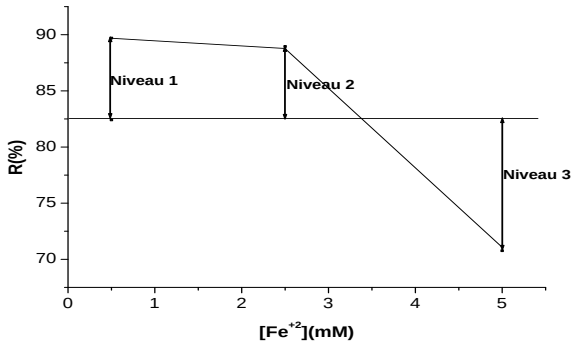
	Effet de [H_2O_2]			Effet de [Fe^{+2}]		
	E[H_2O_2]1	E[H_2O_2]2	E[H_2O_2]3	E[Fe^{+2}]	E[Fe^{+2}]	E[Fe^{+2}]
JD	-10,81	1,10	6,1	7,29	6,54	-11,65
BD	-2,50	9,00	-6,5	-24,53	11,71	12,81

Le rendement moyen général : $R_{moyen(JD)}$=82,41 %

Le rendement moyen général : $R_{moyen(BD)}$= 84,61%

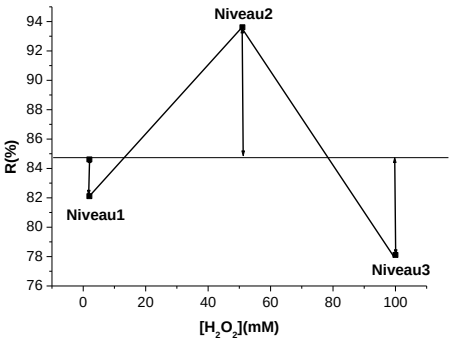


Effet de [H_2O_2]

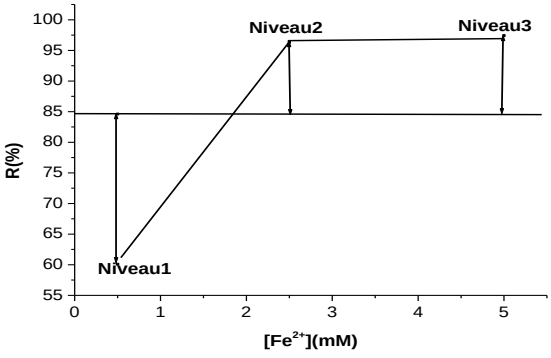


Effet de [Fe^{+2}]

Fig.IV.15 . Effets moyens pour JD106.



Effet de $[H_2O_2]$



Effet de $[Fe^{+2}]$

Fig.IV.16. Effets moyens pour BD77

A partir des figures (IV.15, IV.16), nous avons constaté d'une part que les effets de Fe^{+2} est prédominants que l'effet du H_20_2 .

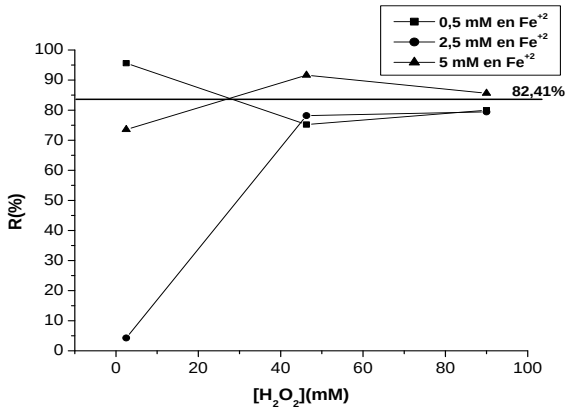
D'autre part, nous avons confirmé le résultat du rendement maximal de décoloration pour les paramètres étudiés aux niveaux correspondants.

♦.2. Résultats des interactions entre les paramètres $[H_2O_2]$ et $[Fe^{+2}]$

Les tableaux récapitulent les résultats de calculs des interactions entre les paramètres ($[Fe^{+2}]$,$[H_2O_2]$,).La figure (IV.17,IV.18) illustre la représentation graphique de ces interactions :

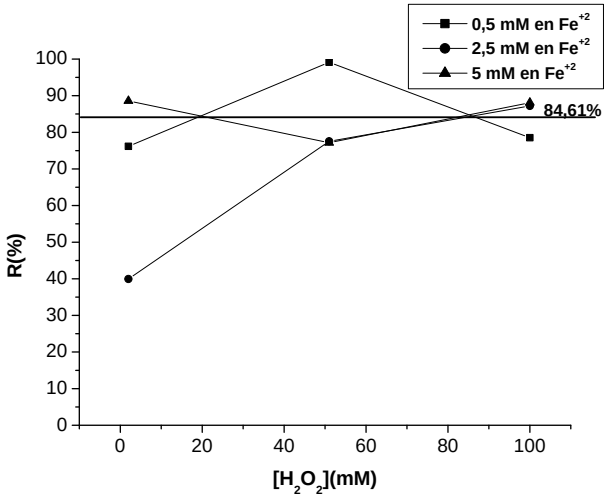
Tableau(IV.16): Interaction entre les paramètres $[H_2O_2]$ et $[Fe^{2+}]$

	Paramètre $[H_2O_2]$ / Paramètre $[Fe^{+2}]$	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
JD	Niveau 1	IN$[Fe^{+2}]1[H_2O_2]1$= 13,22	IN$[Fe^{+2}]1[H_2O_2]2$= -7,19	IN$[Fe^{+2}]1[H_2O_2]$ 3= -2,42
	Niveau 2	IN $[Fe^{+2}]2[H_2O_2]1$= -78,14	IN$[Fe^{+2}]2[H_2O_2]2$= - 4,22	IN$[Fe^{+2}]2[H_2O_2]3$= -2,98
	Niveau 3	IN$[Fe^{+2}]3[H_2O_2]1$= -8,86	IN$[Fe^{+2}]3[H_2O_2]2$= 9,24	IN$[Fe^{+2}]3[H_2O_2]3$= 3,22
BD	Niveau 1	IN$[Fe^{+2}]1[H_2O_2]1$= -8,43	IN$[Fe^{+2}]1[H_2O_2]2$= 14,51	IN$[Fe^{+2}]1[H_2O_2]3$= -6,08
	Niveau 2	IN$[Fe^{+2}]2[H_2O_2]1$= - 44,68	IN$[Fe^{+2}]2[H_2O_2]2$= -7,05	IN $[Fe^{+2}]2[H_2O_2]3$= 2,58
	Niveau 3	IN$[Fe^{+2}]3[H_2O_2]1$= 3,97	IN$[Fe^{2+}]3[H_2O_2]2$= -7,46	IN$[Fe^{+2}]3[H_2O_2]3$= 3,492



Interaction $[H_2O_2]/[Fe^{+2}]$

Fig.IV.17. Interactions entre les paramètres ($[H_2O_2]$,$[Fe^{+2}]$) pour JD106



Interaction $[H_2O_2]/[Fe^{+2}]$

Fig.IV.18. Interactions entre les paramètres ($[H_2O_2]$,$[Fe^{+2}]$) pour BD77

a/ Elaboration du modèle

Après avoir étudié les effets moyens des différents coefficients (calculés individuellement) et les interactions en terme de combinaisons « deux paramètres à deux », nous allons essayer d'établir un modèle type équation 4. La détermination des coefficients de ce modèle est basée

sur une méthode standard [10]. Par conséquent nous sommes arrivés à établir les équations suivantes décrivant la dégradation des colorants JD 106 et BD77 respectivement :

$Y = 79,16+7,56X_1-13,58X_2+ 6\ ,93X_1X_2$……..(9)

$Y= 72,49 -1,53X_1+24,7X_2-0,71X_1X_2$……..(10)

Avec :

X_1 : variable réduite exprimant la concentration du H_2O_2.

X_2 : variable réduite exprimant la concentration du Fe^{+2}.

Y : rendement de décoloration

Afin d'établir l'équation finale de la réponse, on doit étudier statistiquement la significativité des coefficients affectés aux différents paramètres . Pour cela, on utilise le test de Student pour un intervalle de confiance choisi (5% par exemple) et pour le nombre de degrés de liberté basé sur la reproductibilité des résultats (n-1=2) [10]. Dans ce cas nous avons calculé les paramètres t_j (voir tableau.IV.17). Ainsi, les facteurs de Student calculés pour le JD106 et le BD77 ont les valeurs :8,82 et 4,93 respectivement. La comparaison de t_j calculés avec les tables statistiques de Student, (pour une valeur estimée de $t_j = 2,36$), nous a permis de réduire certains coefficients comme indiqué sur le tableau(IV.17).

Par conséquent, les expressions des modèles (équations 9 et 10) se réduisent sous forme pour JD106 et BD77 respectivement :

$Y = 79,16 + 2,75\ X_2$

$Y= 72,49 + 2,8X2$

Les résultats de calcul des nouvelles valeurs de rendement de décoloration pour les deux colorants est donnée sur le tableau(IV.17).

Tableau.IV.17. Résultats de calcul des nouvelles valeurs de rendement de décoloration pour les deux colorants.

JD 106				***Essais***	BD77			
t_j		R(%) calculé	R(%) expr		t_j		R(%) calculé	R(%) expr
t_1	1,53	92,11	92,11	***1***	t_1	0,17	48,91	49,14
t_2	2,75	93,37	93,38	***2***	t_2	2,8	46,97	47,5
T_{12}	1,4	51,09	51,09	***3***	T_{12}	0,08	99,13	98,9
		80,07	80,08	***4***			94,95	94,42

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours cette étude, nous avons essayé d'atteindre les objectifs ciblés au départ, dont nous avons arrivé à établir les résultats suivants :

En premier lieu, et après extraction et purification de la peroxydase de courgette « *CUCURBITA PEPO* », nous avons immobilisé l'extrait purifié par acétone dans une matrice polymérique d'alginate. Les billes obtenus ont des caractéristiques moyennes proches de celles obtenus par d'autres chercheurs ; ces billes possèdent une AE égale à **0,82UI/ml** .

En second lieu, nous avons étudié en appliquant la méthode des plans d'expériences, l'effet de quelques paramètres physico-chimiques : pH, Concentration en colorant, concentration en H_2O_2 et activité de l'enzyme immobilisée, sur le rendement de décoloration des colorants : Jaune Direct 106 et Bleu Disperse 77. Pour une série de 27 essais, et par détermination des effets moyens des paramètres ([colorant], [H_2O_2] et [AE]) et leurs interactions. La valeur du rendement maximale atteinte est : **40,75%** et **67,84 %** , pour le JD 106 et le BD77 respectivement. Ainsi

En troisième lieu,Ainsi le rendement maximal de décoloration par le procédé Fenton pour les deux colorants a atteint à pH=2 pour JD 106 et BD77 des donnés concentrations en colorant, en H_2O_2 et en catalyseur les valeurs de : **89,91%** et **96,30%** respectivement ces rendements correspondent au valeurs :(80mg /l, 20 mM, 2, 5 mM) et (50 mg/l,5 mM,2 mM) pour JD106 ET BD77.

En dernier lieu, les 9 expériences réalisées sur le coulage des procédés de traitement des deux colorants, montrent l'efficacité du procédé, d'où un rendement de **93,38 %** et **98,97%** pour le JD 106 et le BD77 respectivement a été atteint. Dans ce cas, pour des concentrations fixes du colorant,

En perspectives

Le présent travail a permis d'avoir une large idée sur l'utilisation des plans d'expériences dans le traitement des colorants par les procédés enzymatiques seules ou couplés. Il est donc intéressent de poursuivre l'étude en traitant les points suivants :

- Caractérisations chimique et toxicologique des produits de dégradation liquides et solides issus des différents traitements ;

- Extrapolation des différents procédés appliqués à grande échelle, qui peut être une solution très intéressante, surtout pour un pays très riche en tous types de courgette comme l'Algérie.

Références bibliographiques

Références : chapitre I

[1] : Bernard AUGERE « les enzymes biocatalyseurs protéiques » Ellipses edition Marketing S.A.2001.

[2] : Jean Bornarel « cinétique enzymatique »,collection grenoble sciences,athel cornish-Bowden, marc jamin,valdur saks.2005.

[3] : *www.rpi.edu/dept/chem-eng/.../Immob.htm.*

[4] : C. Audigié, F. Zonszain 'Biochimie métabolique'. Doin edition ,groupe Liaison S.A (1995).

[5] : Qayyum Husain "Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes": a review _ Springer Science+Business Media B.V. 2009

[6] : Jose M. Guisan "Immobilization of enzymes and cells" ,999 Riveview Drive,Suite 208 .Totowa,New Jersey 07512.Humana Press Ine 2006.

[7] : Hager Jouili • Houda, Bouazizi • Ezzeddine El Ferjani. "Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress". Acta Physiol Plant (2011) 33:2075–2082.

[8] : Eduardo Torres, Ismael Bustos-Jaimes, Sylvie Le Borgne. "Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants ». Applied Catalysis B: Environmental 46 (2003) 1–15.

[9] : Carlos Regalado, Blanca E. Garc´ıa-Almend´arez1 & Miguel A. Duarte-V´azquez . « Biotechnological applications of peroxidases". Phytochemistry Reviews 3: 243–256, 2004.

[9, 10, 11] : Carlos Regalado, Blanca E. Garc´ıa-Almend´arez1 & Miguel A. Duarte-V´azquez . « Biotechnological applications of peroxidases". Phytochemistry Reviews 3: 243–256, 2004.

Monika Wagner, James A. Nicell. "Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide". Water Research 36 (2002) 4041–4052.

Suhail Akhtar, Qayyum Husain. "Potential applications of immobilized bitter gourd (Momordica charantia) peroxidase in the removal of phenols from polluted water". Chemosphere 65 (2006) 1228–1235.

[12] : Carlos Regalado, Blanca E. Garc´ıa-Almend´arez1 & Miguel A. Duarte-V´azquez « Biotechnological applications of peroxidases » Phytochemistry Reviews 3: 243–256, © Kluwer Academic Publishers (2004).

[13] : L. Geng, N. Li, M. Xiang, X. Wen, D. Xu, F. Zhao, K. Li «The covalenx immobilisatixn of trypsin at the galleries of layered γ-zirconium phoxphate» Coxloids xnd Surfaces B: Biointxrfxces, 30, 2003, p 99-109.

[14]. Silvia Fabiano « application a la réalisation de biocapteurs ampérométriques pour le dosage du glucose et des composés phénoliques , Université Claude Bernard .2002.

[15]. T.Sato, T.Tosa, T.Seiyaku,C.Lid « Enzymes, immobilization Methodes »Osaka, Japan (2006).

[16]. Michel Vaubourdolle « Toxicologie, sciences mathématiques, physiques et chimiques »

[17] : *www.rpi.edu/dept/chem-eng/.../Immob.htm.*

[18]. C. Audigié, F. Zonszain 'Biochimie métabolique'. Doin edition ,groupe Liaiso S.A(1995).

[19]. *http://loschmidt.chemi.muni.cz*

[20].http://popups.ulg.ac.be/Base/document.

[21] :V.Shah'Emeging Envirenmental Technologies'.Editor Vishah shah.Dowling college 150 Idel Hour BLVD.Qakdale NY 11769 USA Volume 2 (2010).

[22] : Mahreen Matto, Qayyum. "Decolorization of textile effluent by bitter gourd peroxidase immobilized on concanavalin A layered calcium alginate–starch beads". Journal of Hazardous Materials 164 (2009) 1540–1546.

[23]: Suhail Akhtar, Amjad Ali Khan, Qayyum Husain. "Potential of immobilized bitter gourd (Momordica charantia) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent". . Chemosphere 60 (2005) 291–301.

[24]: Rukhsana Satar, Qayyum Husain. Catalyzed degradation of disperse dyes by calcium alginate-pectin entrapped bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase , Journal of Environmental Sciences 2011, 23(7) 1135–1142.

[25]: Venkata Mohan, K. Krishna Prasad, N. Chandrasekhara Rao, P.N. Sarma. " Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process".Chemosphere 58 (2005) 1097–1105.

Référence : chapitre II

[1] : Noureddine BARKA, « L'élimination des colorants de synthèse par adsorption sur un phosphate naturel et par dégradation photocatalytique sur TiO2 supporté », thèse de doctorat, université Ibn Zohr, Agadir, 2008.

[2] :Guivarch E. Traitement des polluants organiques en milieux aqueux par le procédé électrochimique d'oxydation avancée « Electro-Fenton ». Application à la minéralisation des colorants synthétiques, Thèse de doctorat de l'université de Marne-la-Vallée, 2004.

[3]: Society of Dyes and Colourist Colour Index, vol. 1, 3ème edition., S.D.C., A. Association of Textile and Chemicals Colour (1984).

[4] : Noura Oubagha, « Decontamination des eaux contenant les colorants textiles et les adjuvants par les materiaux naturels et synthétiques » mémoire de magister, université de Tizi-ouzou, 2011.

[5]: H.S. Freeman and G.N. Mock, "Dye Application, Manufacture of Dye Intermediates and Dyes. Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology,New York 2012

[6]: Zongping Wang, Miaomiao Xue, Kai Huang and Zizheng Liu, "Textile Dyeing wastewater Treatment "*Huazhong University of Science and Technology*, Advances in Treating Textile Effluent, 2011.

[7]: Zollinger H. "Color Chemistry. Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments". 3ème édition, Verlag Helvetica Chimica,(2003) Acta, Zürich.

[8] : Hazrat Ali, "Biodegradation of Synthetic Dyes—A Review", Water Air Soil Pollution, 2010.

[9] : Journal officiel de la république algérienne n° 26 « Décret exécutif n° 06-141 du 20 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 19 avril 2006 définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels. » (2006).

[10]: Specht K., Platzek T., "Textile dyes and finishes - Remarks to toxicological and analytical aspects", Deut. Lebensm.-Rundsch. 91 (1995) 352-359.

[11]: Brown M.A., DeVito S.C., Predicting azo dye toxicity, Critical Review of Environmental Science Technology. 23(1993) 249-324.

[12]: Chung K.T., Fluk G.E., Andrews A.E., Mutagenicity testing of some commonly used dyes, Applied Environmental Microbiology. 42 (1981) 641-648.

[13]: Reid T.M., Morton K.C., Wang C.Y., King C.M., Mutagenicity of azo dyes following metabolism by different reductive/oxidative systems, Environmental Mutagenicity 6 (1984) 705-717.

[14]: Rosenkranz H.S., Klopman G., Structural basis of the mutagenicity of phenylazoaniline dyes, Mutation Ressources. 221 (1989) 217-234.

[15]: Rosenkranz H.S., Klopman G., Structural basis of the mutagenicity of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes, Mutagenesis 5 (1990) (2) 137-146.

[16] : Easton J.R., The dye maker's view, in Colour in dyehouse effluent, P. Cooper, Editor. 1995, Society of Dyers and Colourists: Bradford, England. p. 9-21.

[17]: Pereira MFR, Soares SF, Orfão JJM, Figueiredo JL (2003) Adsorption of dyes on activated carbons: influence of surface chemical groups. Carbon 41:811–821.

[18] : Benguella « Adsorption des colorants textiles sur les argiles Algériens » 2008.

[19] : M. Mazet, O. Dusart, M. Rogee, B. Dussoubs-Marmier, « Elimination de colorants de l'industrie textile par scuires de bois ». Revue des sciences de l'eau. 3(1990), 129-149.

[20] : Nigam, P., Armour, G., Banat, I.M., Singh, D., Marchant, R., 2000. Physical removal of textile dyes and solid state fermentation of dye adsorbed agricultural residues. Bioresource Technology. 72, 219-226.

[21]:L.Pereira and M.Alves, « Dyes—Environmental Impact and Remediation", Environmental Protection Strategies for Sustainable Development, Strategies for Sustainability, 111-162. 2008.

[22]: Lambert S.D., Graham N.J.D., Sollars C.J., Fowler G.D., Evaluation of inorganic adsorbents for the removal of problematic textile dyes and pesticides, Water Science and Technology. 36 (1997) 173-180.

[23]:S.H Lin, "Adsorption of disperse dye by powdered activated carbon", Journal of Chemical of Technology and Biotechnology. 57 (1993) 387-391.

[24]: Ramakrishna K.R., Viraraghavan T., Dye removal using low cost adsorbents, Water Science and Technology.36 (1997) 189-196.

[25]: McKay G., Ramprasad G., Mowli P., Desorption and regeneration of dye colours from low-cost materials. Water Ressource. 21 (1987) 375-377.

[26]: Y. Anjaneyulu, N. Sreedhara Chary2, D. Samuel Suman Raj."Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review"Reviews in Environmental Science and Bio/Technology (2005) 4:245–273.

[27]: Chung KT, Fulk GE, Egan M (1978) Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes. Applied of Environnmental Microbiology 35:558–562.

[28]: Tim Robinson, Geoff McMullan, Roger Marchant, Poonam Nigam. " Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative". Bioresource Technology 77 (2001) 247-255.

[29]: Myrna Solis, Aida Solis, Herminia Ines Perez, Norberto Manjarrez, Maribel Flores." Microbial decolouration of azo dyes: A review", Process Biochemistry 47 (2012) 1723–1748.

[30]: Pearce CI, Lloyd JR, Guthrie JT (2003) The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. Dyes and Pigments 58:179–196.

[31]: Seignez C, Adler **N**, Suard J C, Peringer P (1996) Aerobic and anaerobic biodegradability of 1-anthraquinone sulphonate. Applied Microbiology Biotechnology. 45:719-722.

[32]: Couto SR (2009) Dye removal by immobilised fungi. Biotechnology Advanced 27:227–235, 2008.

[33]: Ramesh Chander Kuhad , Rishi Gupta , and Yogender Pal Khasa. Chapter 35 Microbial Decolorization of Colored Industrial Effluents » *Microorganisms in Environmental Management:Microbes and Environment*, 2012.

[34] Bhatnagar A, Sillanpaa M. Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment: a review. Chemical Engineering Journal 2010;157:277–96.

[35]: Y. Sugano, Y. Matsushima, K. Tsuchiya, H. Aoki, M. Hirai, M. Shoda, " Degradation pathway of an anthraquinone dye catalyzed by a unique peroxidase DyP from Thanatephorus cucumeris Dec1". Biodegradation (2009) 433-440.

[36]: Q.Husain, M. Husain "Peroxidases as a Potential Tool for the Decolorization and Removal of Synthetic Dyes from Polluted Water". Environmental Protection Strategies for Sustainable Development, Strategies for Sustainability (2012)

[37]: Liu JQ, Liu HT Degradation of azo dyes by algae. Environmental Pollution 75:273–278, (1992).

[38]: Glaze WH, Kang JW & Chapin DH (1987) The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide, and ultraviolet radiation. Ozone Science Engineering. 9: 335–352.

[39]: Shu, H. Y., & Chang, M. C. (2005). Pre-ozonation coupled with UV/H2O2 process for the decoloration and mineralization of cotton dyeing effluent and synthesized C. I. Direct Black 22 wastewater. Journal of Hazardous Materials, 121, 127–133.

[40]: Rosenfeldt, E. J., Chen, P. J., Kullmanc, S., & Linden, K. G. (2007). Destruction of estrogenic activity in water using UV advanced oxidation. The Science of the Total Environment, 377, 105–113.

[41] : Skoumal, M., Cabot, P. L., Centellas, F., Arias, C., Rodríguez, R. M., Garrido, J. A., et al. (2006). Mineralization of paracetamol by ozonation catalyzed with Fe2+, Cu2+ and UVA light. Applied Catalysis B Environmental, 66, 228–240.

[42] : Cañizares, P., Paz, R., Saez, C., & Rodrigo, M. A. (2009). Costs of the electrochemical oxidation of wastewaters: a comparison with ozonation and Fenton oxidation processes. Journal of Environmental Management, 90, 410–420.

[43] : Samiha Hamani. 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 Faculté des Sciences de Tunis. 2008.

[44] : J. M. Poyatos, M. M. Muñio, M. C. Almecija, J. C. Torres, E. Hontoria, F. Osorio. "Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: State of the Art". Water Air and Soil Pollution (2010) 205:187–204.

[45]: Legrini O., Oliveros E., Braun A.M., Photochemical processes for water treatment, Chemical Review. 93 (1993) 671-698

[46]: Venkatadri R., Peters R.W., Chemical oxidation technologies: Ultraviolet light/hydrogen peroxide, Fenton's reagent, and titanium dioxide-assisted photocatalysis, Hazard. Waste Hazard. Mater. 10 (1993) 107-131.

[47]: Shu, H. Y., & Chang, M. C. (2005). Pre-ozonation coupled with UV/H2O2 process for the decoloration and mineralization of cotton dyeing effluent and synthesized C. I. Direct Black 22 wastewater. Journal of Hazardous Materials, 121, 127–133.

[48] : Fdil F., Aaron J-J., Oturan N., Chaouch A., Oturan M.A., Dégradation photochimique d'herbicides chlorophénoxyalcanoïques en milieux aqueux, Rev. Sciences de l'Eau 16 (2003) 123-142.

[49]: Huaili Z., Yunxia P., Xinyi X., Oxidation of acidic dye Eosin Y by the solar photo-Fenton processes, Journal of Hazardous Materials.141 (2007) 457–464.

[50]: Gernak W., Krutzler T., Glaser A., Malato S., Caceres J., Bauer R., Fermandez-Alba A. R., Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants, Chemosphere 50 (1) (2003) 71-78.

[51]: Kiwi J., Pulgarin C., Peringer P., Effect of Fenton and photo-Fenton reactions on the degradation and biodgradation of 2-Nitrophenols in water treatment, Applied Catalysis. B: Environmental. 3 (1994) 335-350.

[52]: Bandara J., Morrison C., Kiwi J., Pulgarin C., Peringer P., Degradation/decoloration of concentrated solutions of Orange II – Kinetics and quantum yield for sunlight-induced

reactions via Fenton type reagents, Journal of Photochemical and Photobiology. A: Chemistry 99 (1996) 57-66.

[53]: Aparna R., Hament K. R., Rakesh K. S., Photodegradation of Direct Yellow-12 using UV/H2O2/Fe2+, Journal of Hazardous Materials. B102 (2003) 231–241.

[54]: Maitha M.A., Rauf M.A., Ashraf S.S., A comparative study of Neutral Red decoloration by photo-Fenton and photocatalytic processes, Dyes and Pigments 76 (2008) 332-337.

[55]: Poulopoulos S.G., Nikolaki M., Karampetsos D., Philippopoulos C.J.,Photochemical treatment of 2-chlorophenol aqueous solutions using ultraviolet radiation, hydrogen peroxide and photo-Fenton reaction, Journal of Hazardous Materials. 153(2008) 582–587.

[56]: Herrmann J.M., Guillard C., Arguello M., Aguera A., Tejedor A., Piedra L., Fernandez-Alba A., Photocatalytic degradation of pesticide pirimiphos-methyl. Determination of the reaction pathway and identification of intermediate products by various analytical methods, Catalyse Today 54 (1999) 353-367.

[57]: Konstantinou K.I., Albanis A.T., Photocatalytic transformation of pesticides in aqueous titanium dioxide suspensions using artificial and solar light: Intermediates and degradation pathways, Applied Catalysis B : Environmental. 42 (2003) 319-335.

[58]: Hernandez R., Zappi M., Colucci J., Jones R., Comparing the performance of various advanced oxidation processes for treatment of acetone contaminated water, Journal of Hazardous Materials. 92 (2002) 33-50.

[59]: E. Neyens, J. Baeyens. "Review A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique".Journal of Hazardous Materials B98 (2003) 33–50.

[60] : Belhadj Hamza. « Dégradation photochimique du rose de Bengale (Colorant xanthénique) par différents procédés d'oxydation avancée et sur des supports inorganiques chromophores en solution aqueuse ». Mémoire de Magister, Univerité Mentouri, Constantine, 2011.

[61] : Comninellis C., Pulgarin C., Electrochemical oxidation of phenol for wastewater treatment using SnO_2 anodes, Journal of Applied Electrochemistry. 23 (1993) 108-112.

[62]: Tahar N.B., Savall A., Electrochemical degradation of phenol in aqueous solution on bismuth doped lead dioxide: a comparison of the activities of various electrode formulations, Journal od Applied. Electrochemistry. 29 (1999) 277-283.

[63]: Li X.Y., Cui Y.H., Feng Y.J., Xie Z.M., Gu J.D., Reaction pathways and mechanisms of the electrochemical degradation of phenol on different electrodes, Water Ressources. 39 (2005) 1972-1981.

[64]: Feng J., Houk L.L., Johnson D.C., Lowery S.N., Carey J.J., Electrochemical of anodic oxygen transfer reactions: The electrochemical incineration of benzoquinone, Journal of Electrochemical Society. 142 (1995) 3626-3631.

[65] Comninellis C., Pulgarin C., Anodic oxidation of phenol for wastewater treatment. Journal of Applied Electrochemistry. 21 (1991) 703-708.

[66]: Brillas E., Mur E., Sauleda R., Sanchez L., Peral J., Domenech X., Casado J., Aniline mineralization by AOP's: anodic oxidation, photocatalysis, electro-Fenton and photo-Fenton processes, Applied of Catalysis. B: Environmental. 16 (1998) 31-42.

[67]: Oturan M.A., An ecologically effective water treatment technique using electrochemically generated hydroxyl radicals for in situ destruction of organic pollutants. Application to herbicide 2,4-D, Journal of Applied Electrochemistry. 30 (2000) 477-478.

[68]: Boye, M.M. Dieng., E. Brillas., "Degradation of herbicide 4-chlorophenoxyacetic acid by advanced electrochemical oxidation methods", Environmantal Science and Technology. 36 (2002) 3030-3035.

[69] : N. Bellakhal., M. Dachraoui., N. Oturan., M.A.Oturan., "Degradation of tartrazine in water by electro-Fenton process", Journal of Society Chim Tun. 8 (2006) 223-228.

[70]: E. Brillas, J. Casado., "Aniline degradation by electro-Fenton and peroxy-coagulation processes using a flow reactor for wastewater treatment", Chemosphere 47 (2002)241-248.

[71]: L. Gianfreda, MA Rao. "Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review". Enzyme Microbiology Technology (2004) 35:339–354.

[72]: C. Held, A. Kandelbauer, M. Schroeder, A. Cavaco-Paulo, GM. Guebitz " Biotransformation of phenolics with laccase containing bacterial spores". Environmental Chemical Letter (2005) 3:74–77.

[73]: Q. Husain . "Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. Critical Review of Biotechnology, (2006) 60:201–221.

[74]: S. Sumathi, BS. Manju " Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus.* Enzyme Microbiology Technology, (2000) 27:347–355.

[75]: S. Rodriguez-Couto Enzymatic biotransformation of synthetic dyes. Current Drug Metabolism. (2009) 10 (9):1048–1054.

[76]: Q. Husain. **"**Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. Review of Environmental Science and Biotechnology (2010) 9:117–140.

[77]; R. Khan, P. Bhawana • M. H. Fulekar**.** Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. Review of Environmental Science and Biotechnology (2013) 12:75–97.

[78] : A. Zille. « Laccase Reactions for Textile Applications »Thèse de Doctorat Université de Minho. 2005.

[79]: N. Durán, E. Esposito. "Review Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review" Applied Catalysis B: Environmental 28 (2000) 83–99.

[80]: Q. Husain, "Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review". Review of Environmental Science and Biotechnology (2010) 9:117–140.

[81]: Nilesh P. Tantak, Sanjeev Chaudhari, " Degradation of azo dyes by sequential Fenton's oxidation and aerobis biological treatment". Journaal of Hazardous Materials, B136 (2006) 698-705.

[82]: H. Zhang, J.Zhang, C. Zhang, Fang Liu, Daobin Zhang. Degradation of C.I. Acid Orange 7 by the advanced Fenton process in combination with ultrasonic irradiation. Ultrasonics Sonochemistry 16 (2009) 325–330.

[83]: U.Bali, Bu¨nyamin Karago¨zog˘lu. "Performance comparison of Fenton process, ferric coagulation and H2O2/pyridine/Cu(II) system for decolorization of Remazol Turquoise Blue G-133 ». Dyes and Pigments 74 (2007) 73-80.

[84]: Jian-Hui Sun, Sheng-Peng Sun, Jing-Yu Sun, Rui-Xia Sun, Li-Ping Qiao, Hui-Qin Guo, Mao-Hong Fan. "Degradation of azo dye Acid black 1 using low concentration iron of Fenton process facilitated by ultrasonic irradiation". Ultrasonics Sonochemistry 14 (2007) 761–766.

Références de : Partie Expérimentale

[1]: Suhail Akhtar, Amjad Ali Khan, Qayyum Husain. " Partially purified bitter gourd(Momordica charantia) peroxidase catalyzed decolorization of tectile and other industrially important dyes. Bioressource Technology. (2005).

[2] : Cinthia Gandolfi Boer, Larissa Obici, Cristina Giatti Marques de Souza,
Rosane Marina Peralta. Purification and some properties of Mn peroxidase from Lentinula edodes. Process Biochemistry 41 (2006) 1203–1207.

[3]:F. Ghaemmaghami, I. Alemzadeh, S. Motamed. " Seed Coat Peroxidase: Extraction and Biocatalytic properties determination. Iranian Journal of Chemical Engineering. (2010).

[4]: S. Maria ,A. Guelli ,U de Souza , E.Forgiarini,A. Augusto, U.de Souza "Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP)"2007 Journal of Hazardous Materials 147 (2007) 1073–1078.

[5] :C. Nigma, I.-F. Tsao, A. Sakoda, H.Y. wang, "Techniques for preparing hydrogel membrane capsule, Biotechnology .Technology. 2(1988)271-276.

[6]: S. Venkata Mohan, K. Krishna Prasad, N. Chandrasekhara Rao, P.N. Sarma * "Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process"Biochemical and Environmental Engineering Centre, Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad 500 007, India Received 11 June 2003; received in revised form 6 September 2004; accepted 15 September 2004.

[7] :S. Maria ,A. Guelli ,U de Souza, E.Forgiarini,A. Augusto, U.de Souza "Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP)"2007 Journal of Hazardous Materials 147 (2007) 1073–1078.

[8]: S .Rukhsana et H. Qayyum * "Use of Bitter Gourd (Momordica charantia) Peroxidase Together with Redox Mediators to Decolorize Disperse Dyes" Biotechnology and Bioprocess Engineering 2009, 14: 213-219 2009.

[9]: P.K. Malik ,S.K. Saha b "Oxidation of direct dyes with hydrogen peroxide using ferrous ion as catalyst" .A Department of Chemical Engineering, Jadavpur University, Calcutta 700032, India b Department of Material Science and Technology, Faculty of Engineering, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu-Shi 501-1193, Japan Received 20 June 2002; received in revised form 25 October 2002; accepted 27 October 2002.

[10] :T.Philippe « notions de bases sur les plans d'expériences »Lycée Niepce – Chalon sur Saône.2008.

[A1]: M.A Oturan., N. Oturan., J.J Aaron, Traitement des micropolluants organiques dans l'eau par des procédés d'oxydation avancée, Actual. Chimique 277-278 (2004) .

Symboles et Abréviations

AE : Activité enzymatique

JD106 : Jaune Direct

BD 77 : Bleu Dispersé

EB : Extrait enzymatique brut

EEPP : Extrait enzymatique partiellement purifiée

$[\ ]_0$:Concentration initiale

DO : Densité optique

R^2 : Coefficient de corrélation

Ɛ :Coefficient d'extinction molaire(l/mol)

t: temps (min)

pH_{opt} : potentiel d'hydrogène optimal

R :Rendement de décoloration (%)

λ_{max} :Longueur d'onde correspondante à l'absorbance maximale (nm)

V m :Volume moyen des billes (cm^3)

$m_{m:}$ Masse moyen des billes (mg)

ρ_m : Masse volumique moyen des billes (mg/cm^3)

$D_{m:}$ Diamètre moyen des billes (cm)

DCO : Demande chimique en oxygène (mg/l)

DBO : Demande biologique en oxygène (mg/l)

COT : Carbone organique totale (mg/l)

Y : réponse du modèle

X_1, X_2,X_3 : variables réduites

ANNEXE

Annexe 1 : Tableau des réactions Fenton

Tableau A.1. Les principales réactions intervenant dans le système de Fenton et les Constantes cinétiques correspondantes [A1].

Réaction	Constante de vitesse ($M^{-1}.L.s^{-1}$)	Equation N°
Initiation : $H_2O_2 + F^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\bullet$	55	AI
Catalyse: Régénération du Fe^{2+}: $H_2O^\bullet + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + HO_2^\bullet + H^+$ $Fe^{3+} + HO_2^\bullet \rightarrow Fe^{2+} + O_2 + H^+$ $Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$	$3{,}1.\ 10^{-3}$ 2.10^4 5.10^7	AII AIII AIV
Propagation: $OH^\bullet + H_2O_2 \rightarrow H_2O + HO_2^\bullet$ $HO_2^\bullet \rightarrow H^+ + O_2^{\bullet-}$ $RH + OH\bullet \rightarrow R^\bullet + H_2O$ $ArH + OH\bullet \rightarrow ArHOH$	$3{,}3.10^7$ $1{,}6.10^5$ 10^7-10^9 10^8-10^{10}	AV AVI AVII AVIII

Annexe 2 : Verrerie consommable

- Tubes à essai.
- Fioles jaugées (10, 20, 50, 100, 250,1000ml).
- Pipettes (1, 2, 5,10ml).
- Erlenmeyers.
- Eprouvettes (50ml).
- Cristallisoir.
- Béchers.
- Eprouvettes.
- Les entonnoirs.
- Les burettes.

Annexe 3 : Existence de la peroxydase dans la courgette.

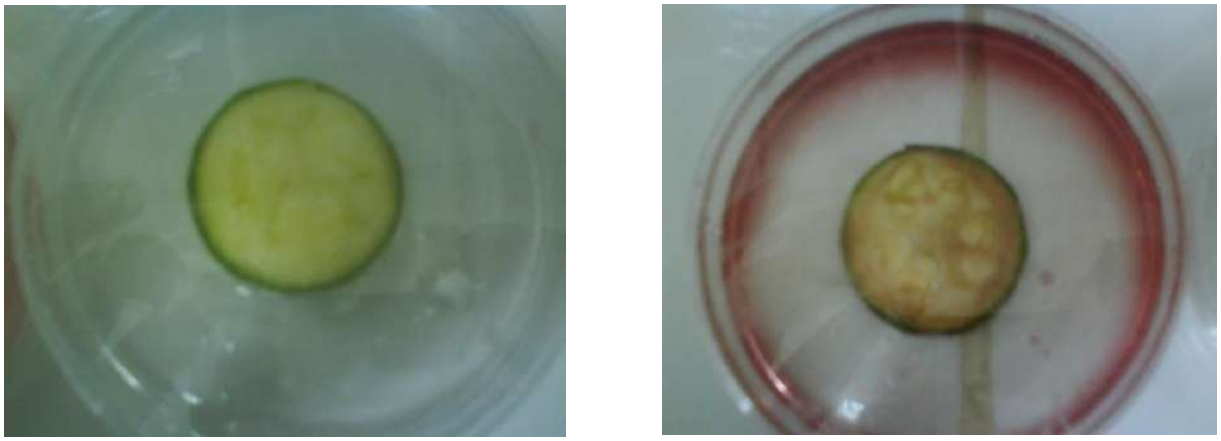
Méthode : le mélange réactionnel est préparé comme suit :

Dans une fiole de 25 ml introduire :

- 2ml de solution tampon pH7.
- 1ml d' H_2O_2 de concentration 0,01M.
- 1ml de 4- Amino –antipyrine à 0.001M.
- 1ml de phénol à 0.01M.

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

Résultats.



Avant **Après**

Fig. A.1.mise en évidence de l'activité catalytique de la peroxydase dans la courgette.

Les tissus contenant de la peroxydase vont apparaitre colorés en brun rose.

Annexe 4 : dosage des protéines.

Méthode de Bradford :

La quantité des protéines totale de chaque extrait (brute, partiellement purifié) est réalisée selon la méthode de Bradford [5]. Cette méthode est basée sur le changement de couleur de bleu de Coomassie en fonction de la concentration des protéines.

La concentration est déterminée à l'aide d'un courbe étalon de sérum d'albumine bovin SAB ,en ajoutant 0.1 ml de sérum à différentes concentration au 5 ml de réactif de Coomassie et 0,25ml de Hydroxyde de sodium (NaOH) de concentration 1 M .La densité optique de chaque échantillon sera observé en mesurant l'absorbance a 595 nm.

Lee réactifs de utilisées ont les compositions chimiques suivants :

- Réactifs(1) : Réactifs de Bradford contient :
  - Bleu de Coomassie (100mg /l).
  - Ethanol 95% (50ml).
  - $H_2\ PO_4$85% (100ml).

Le mélange reste 24h sous agitation à l'obscurité puis on fait un filtration par papier filtre.

- Réactifs(2) : Hydroxyde de sodium(NaOH) 1M.
- Réactifs(3) : Gamme d'étalonnage et dosage de la solution

On réalise une gamme d'étalonnage contenant 0 à100mg /l de protéine à partir d'une solution mère de 100mg /l.

La détermination de la courbe d'étalonnage de sérum d'albumine bovin (SAB) est résumée dans le tableau Suivant :

Tableau A.2 : Tableau des courbes d'étalonnage de sérum d'albumine(SAB).

C (mg /l)	0	20	40	60	80	100
V_{Etalon}	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
V_{NaOH}	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl
$V_{réactif\ de\ Bradford}$	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml

- Agiter puis placer les tubes 10min pour développer la coloration.
- Mesurer l'absorbance à 590 nm (la coloration est stable pendant 1h).

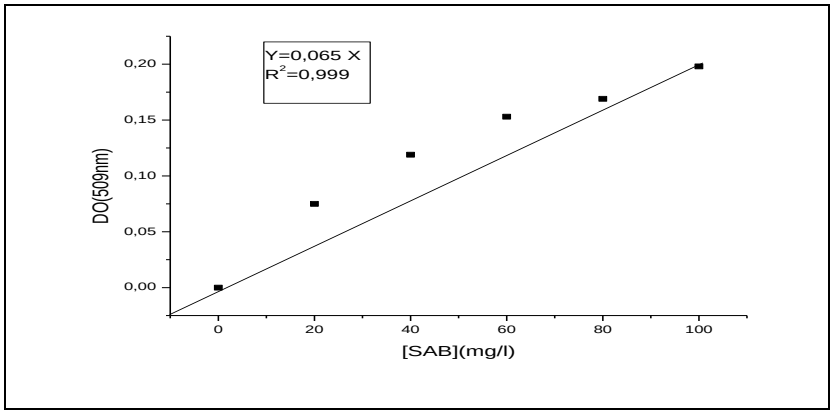


Fig.A.2. Courbe d'étalonnage de sérum d'albumine [SAB].

Procédure :

Prendre 2 tubes a essaies, dans le premier 20 µl d'EEPP et dans le deuxième le même volume en EEB ensuite ajouter a chaque tube :

- 5 ml de réactif de Bradford.
- 250 µl de NaOH (1M).

- Laisser la coloration pour développer pendant 10 minutes.
- Doser directement la quantité des protéines a l'aide de spectrophotomètre.

Annexe 5 : la courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Procédure :

La peroxydase d'hydrogène (H_2O_2) à 30 % est utilisée comme solution stock à partir de laquelle seront faites les différentes dilutions permettant d'obtenir des concentrations moindres. Ensuit réaliser la l'expérience suivante.

Prendre 8 tubes a essaies, dans chaque un introduire :

- 1ml de phénol (0,01M)
- 1ml de 4-amino-antipyrine (0,001M).
- 1ml de H2O2 à différentes concentration [2×10^{-5} à2×10^{-4}]mole/l.
- 2ml de solution tampon pH7 .

Au temps t_0,le chronomètre est déclenchée immédiatement après l'injection de 0,2 ml de EEPP dans le tube qui contient le mélange réactionnelle, verser le contenue de la tube dans la cuve est prendre la valeur de densité optique après la stabilisation .la même opération est répétée pour les diverses concentration étudiée après un rinçage soigneux de la cuve.

Résultats :

Les valeurs de DO obtenus pour les différentes concentrations sont les suivants :

Tableau A.3.Résultats des courbes d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)**.**

[H_2O_2] mol/l.	2×10^{-5}	4×10^{-5}	6×10^{-5}	8×10^{-5}	10^{-4}	$1,2\times10^{-4}$	$1,4\times10^{-4}$
DO	0,107	0,169	0,204	0,381	0,472	0,628	0,691

$1,6\times10^{-4}$	$1,8\times10^{-4}$	2×10^{-4}
0,711	0,732	0,735

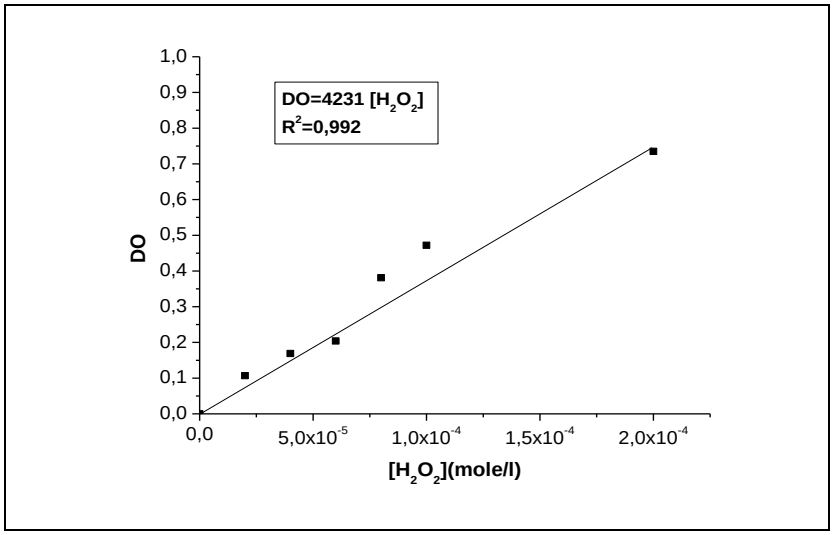


Fig. A.3. Courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Annexe 6 : préparation et étalonnage des colorants

Les solutions aqueuses des colorants de JD 106 (50 mg/l) et BD77 (50 mg/l) étudiées, sont préparées par dissolution respective de leur poudre dans de l'eau distillée. Une étude de son spectre UV-visible à des longueurs d'ondes comprise entre 200 et 800nm, permettre de déterminer la longueur d'onde maximal.

La droite d'étalonnage, représentant la densité optique (ou absorbance) relative au maximum d'absorption, en fonction de la concentration C, obéissant ainsi à la loi de Beer-Lambert qui s'écrit comme suite :

$$\textbf{Log (I0 /I) = Ɛ.C.L}$$

Ou Log (I0 /I) = l'Absorbance A

Avec:

Ɛ: Coefficient d'extinction.

C : Concentration.

L : Epaisseur de la cuve (cm).

I0 : L'intensité de l'énergie d'irradiation arrivant sur l'échantillon (Lumière incidente).

I : L'intensité de la radiation qui a traversé l'échantillon (Lumière transmise).

1-Colorant Jaune direct JD106

La longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption max qui est de l'ordre de 394nm (Fig.A.4).

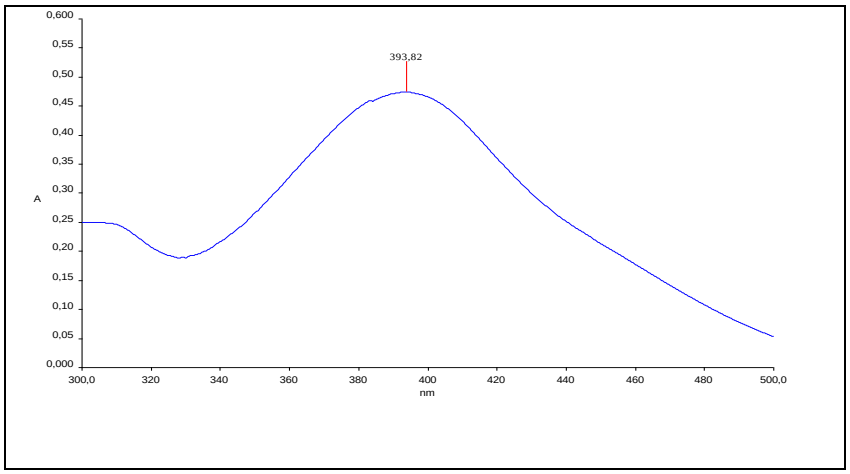


Fig.A.4. Spectre d'absorption de JD 106 dans la gamme de (220-500) nm.

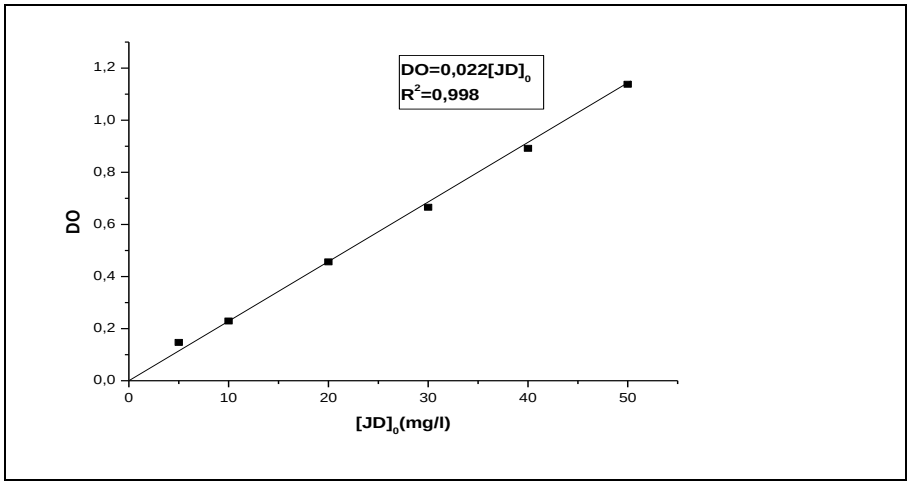


Fig. A.5. Courbe d'étalonnage de JD 106 (pH 7, T=25°C, λmax=394 nm).

2-Colorant Blue dispersé BD 77

La longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption max qui est de l'ordre de 628 nm (Fig.A.6).

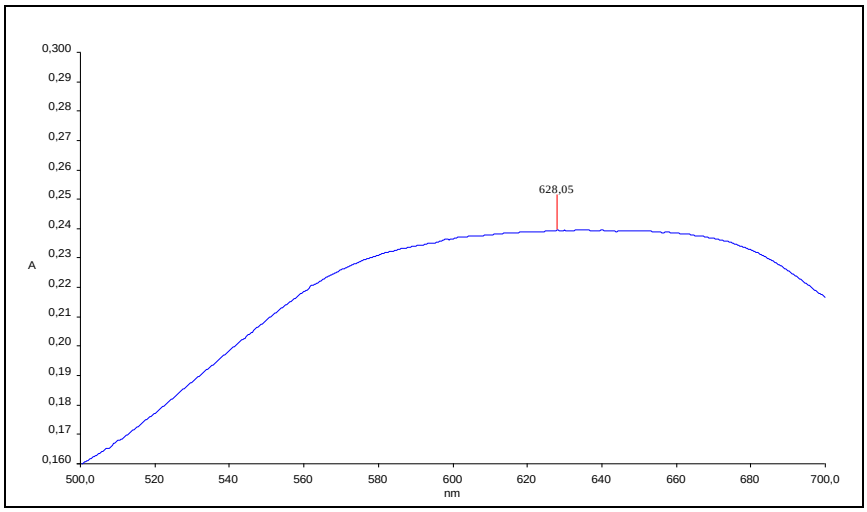


Fig. A.6. Spectre d'absorption de BD 77 dans la gamme de (500-700) nm.

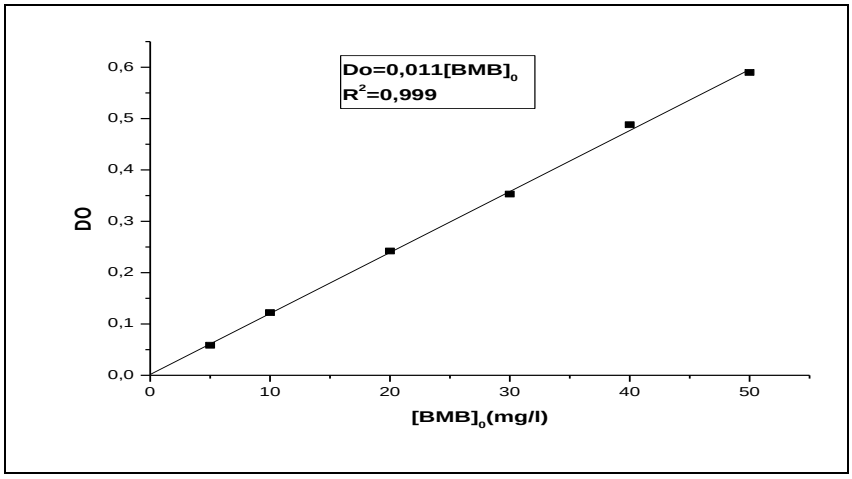


Fig. A.7. Courbe d'étalonnage de BD 77 (pH 7, T=25°C, λmax=628 nm).

Chapitre I

Généralités sur Les enzymes, les peroxydases et l'immobilisation des enzymes.

Chapitre II

Colorants textiles, méthodes de traitement et couplage des procédés.

Chapitre III

Matériels et Méthodes

INTRODUCTION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Chapitre IV

Résultats et Discussions

PARTIE THEORIQUE

PARTIE EXPRIMENTALE

ANNEXE