République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Yahia Fares de Médéa

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

Laboratoire de Biomatériaux et Phénomènes de Transport

Mémoire de Master

Présenté par : Hamida BOUHENICHE & Meriem AZIZI

Licences en Bioprocédés Pharmaceutiques: Université Y. F., Médéa.

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Bioprocédés Pharmaceutiques

Thème

BIODÉGRADATION DU PHÉNOL PAR LA PEROXYDASE LIBRE ET IMMOBILISÉE EXTRAITE À PARTIR DE NAVET BLANC

Dirigé par :

Mr. M. ABOUSAOUD	Maitre de conférences (A), UYFM	**Directeur de mémoire**
Mr. A.AZIZI	Maître Assistant (B), UATL	**Co-Directeur de mémoire**

Année universitaire 2012-2013

TABLE DES MATÈIRES

TABLE DES MATIÈRES …… i
ABRÉVIATIONS ……... iv
NOMENCLAUTRES …….. iv
LISTE DES TABLEAUX ……... x
LISTE DES GIGURES …….. xi
INTRODUCTION GÉNÉRALE ……... 1

CHAPITRE 1: GÉNÉRALITÉS SUR LE PHÉNOL ET LES TRAITEMENTS DES EFFLUENTS LE CONTENANT……..... 3
1.1. Introduction……..……..... 3
1.2. Propriétés du phénol…….…..... 4
1.2.1. propriétés oxydantes …… 4
1.2.2. propriétés acido-basique…… 4
1.2.3. propriétés spectrale…… 5
1.3. Toxicité et écotoxicité du phénol ……..... 5
1.4. Les méthodes de production du phénol……..……..…… 8
1.5. Effluents riches en composés phénoliques ……..…… 9
1.6. Différentes voies de dégradation des composés phénoliques……..…… 10
1.6.1 Élimination par voie physique. ……..…..... 10
1.6.2 Dégradation par voies chimiques……..……..…….. 11
1.6.3 Dégradation par des micro-organismes..……..…….…..... 12
1.6.4 Dégradation par des enzymes…….…..... 12
1.7. Conclusion…….. 13

CHAPITRE 2: BIOPROCÉDÉS ENZYMATIQUES…….…..... 14
2.1. Introduction…….…..... 14
2.2. Définition des enzymes…….…..... 14
2.3. Classification et nomenclature……..……..... 14
2.4. Structure des enzymes…….. 15
2.5. Notion du site actif……. 15
2.6 Unités d'activité…… 17
2.7 Cinétique enzymatique…….…..... 17
2.7.1 Equation de Michaelis-Menten…….. 17
2.7.2 Facteurs influençant la vitesse d'une réaction enzymatique…… 20
2.7.2.1 Effet de la température……... 20
2.7.2.2 Effet du pH…….…… 21
2.7.2.3 Effet de la force ionique……..……... 22
2.8 Peroxydases……..…..... 22

2.8.1 Structure de la peroxydase…… 23
2.8.2 Les applications de la peroxydase …….. 24
2.8.2.1Traitementdes composés phénoliques……. 24
2.8.2.2 Production des colorants alimentaires……... 24
2.8.2.3 Propriété antibactérienne de la peroxydase……..... 24
2.8.2.4 Utilisation de la peroxydase dans des produits cosmétiques……. 24
2.8.2.5 Synthèse organique……..... 25
2.8.2.6 Biocapteurs à base de la peroxydase……... 25
2.9 Immobilisation des enzymes…….. 25
2.9.1 Techniques d'immobilisation……..…… 26
2.9.2. Supports d'immobilisation……..……... 28
2.9.2.1 Classification des supports……. 28
2.9.2.2 Alginate de calcium (support de choix)……..... 28
2.9.3 Propriétés des enzymes immobilisées……. 29
2.9.3.1Propriétés physico-chimiques …….. 29
2.9.3.2 Propriétés cinétique…….. 29
2.10. conclusion ……..... 29

CHAPITRE 3: ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA BIODÉGRADATION DU PHÉNOL PAR LA PEROXYDASE LIBRE ET IMMOBILISÉ……. 31

3.1 Introduction ……..… 31
3.2 Protocoles expérimentaux et méthodes analytiques …… 31
3.2.1 Produits chimiques utilisés …….. 31
3.2.2 Préparations des échantillons ……...……... 32
3.2.3 Préparation des solutions tampons…….. 32
3.2.4 Les méthodes analytiques ……..... 32
3.2.4.1 Méthode de dosage du phénol ……. 32
3.2.4.2 Méthode de dosage de l'activité enzymatique (UI/ml) d'enzyme libre…….. 34
3.2.4.3 Méthode de dosage des protéines totales (mg/ml) …….. 35
3.3 Biodégradation du phénol par la peroxydase libre…… 36
3.3.1 Méthode d'extraction et purification de peroxydase de navet blanc ……..... 36
3.3.2 Effet des paramètres opératoires sur le rendement et la vitesse de biodégradation du phénol …….. 37
3.3.2.1 Effet du pH du milieu…….. 38
3.3.2.2 Effet du température du milieu…… 39
3.3.2.3 Effet de la concentration initial de phénol …….. 40
3.3.2.4 Représentation de Lineweaver-Burk ……. 43
3.3.2.5 Effet de la concentration initial de H_2O_2 .…….. 43
3.3.2.6 Effet de l'activité d'enzyme total ……..…… 44
3.3.2.7 Effet du temps de contact …….. 45
3.4 Biodégradation du phénol par la peroxydase encapsulé par l'alginate de sodium ….... 46
3.4.1 Support d'encapsulation …….. 46

3.4.2 Méthode d'encapsulation d'enzyme ……..... 46
3.4.3Caractéristiques physico-chimiques de billes encapsulées …… 48
3.4.4 Méthode de dosage de l'activité enzymatique des billes encapsulées…… 48
3.4.5 Essais la de biodégradation du phénol par la peroxydase immobilisée…… 49
3.4.5 Suivi des paramètres opératoires en fonction du rendement et la vitesse de biodégradation du phénol…… 49
3.4.5.1 Suivi du pH…… 49
3.4.5.2 Suivi de la température de milieu…….. 50
3.4.5.3 Suivi de la concentration du phénol.....…. 51
3.4.5.4 Représentation de Lineweaver-Burk ……..... 53
3.4.5.5 Suivi de la concentration du peroxyde d'hydrogène …..……..... 54
3.4.5.6 Suivi de la concentration de l'activité enzymatique……..... 55
3.4.5.7 Suivi de nombre des billes de peroxydase encapsulées …… 56
3.4.5.8 Suivi du temps de contact ……..... 57
3.4.5.9 Réutilisation de l'enzyme encapsulé ……..... 57
3.4.5.10 conclusion-Comparaison de performance des deux procédés enzymatiques ……... 59

CONCLUSION GÉNÉRALE …… 61
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES……. 63
ANNEXES…… 67

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1| Structure de la molécule de phénol…….. 3
Figure 1.2| Stabilité ion phénolate …… 4
Figure 1.3| Spectre UV du phénol……..…….. 5
Figure 1.4| Oxydation du cumène ……..... 9
Figure 1.5| Décomposition de l'hydropéroxyde de cumyle…… .. 9
Figure 2.1| Localisation du site actif…….... 16
Figure 2.2| La forme clé-serrure …… . 16
Figure 2.3| La forme induite ……..…… 16
Figure 2.4| Evolution de la concentration des espèces réagissantes pour K_{+1} K_{-1} K_{+2}…… 18
Figure 2.5| Représentation graphique d'une cinétique michaélienne…… 19
Figure 2.6| Représentation graphique de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten… 20
Figure 2.7| Influence de la température sur la vitesse d'une réaction chimique……. ….. 21
Figure 2.8| Effet de pH sur la vitesse de la réaction…….. 21
Figure 2.9| Représentation schématique du mécanisme réactionnel de la peroxydase de raifort (AH2 : composé phénolique AH* : radical phénoxy)…….……..... 22
Figure 2.10| Structure général du peroxydase…… 23
Figure 2.11| Polymérisation des phénols catalysés par horseradich peroxydases (HRP)…… 24
Figure 2.12| Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation des enzymes……... 27
Figure 2.13| Structure de l'alginate de sodium……. 29
Figure 3.1| Courbes d'étalonnage du phénol, *pH=7, T≈ 25 °C*……. 33
Figure 3.2| Courbes d'étalonnage du phénol, *pH=8, T≈ 25 °C*……..... 34
Figure 3.3| Courbe d'étalonnage de l'abumine……... 35
Figure 3.4| Extrait enzymatique partiellement purifié (EEPP)…… 36
Figure 3.5| Évolution du pH du milieu sur le rendement d'élimination du phénol par la peroxydase libre 38
Figure 3.6| Évolution du de la température du milieu sur le rendement d'élimination du phénol par la peroxydase libre…… 39
Figure 3.7| Évolution temporelle de la vitesse de biodégradation de phénol présent dans le surnageant de milieu réactionnel ……..……. 40
Figure 3.8| Évolution temporelle du rendement de biodégradation de phénol présent dans le surnageant de milieu réactionnel……. ….. 40
Figure 3.9| Effet de la concentration initial du phénol sur la vitesse initial et le rendement de biodégradation du phénol…… 41
Figure 3.10| Représentation graphique Lineweaver-Burk……. 42
Figure 3.11| Influence de la concentration de peroxyde d'hydrogène sur le rendement de biodégradation du phénol par la peroxydase libre…… .. 43
Figure 3.12| Influence de l'activité enzymatique totale sur l'élimination du phénol par la peroxydase libre…… 44
Figure 3.13| Cinétique de biodégradation du phénol sous les conditions optimales ……. 45
Figure 3.14| Peroxydase immobilisée par l'alginate de sodium……..... .. 46
Figure 3.15| Influence du pH de milieu sur le taux d'abattement du phénol …….. 48
Figure 3.16| Influence de la température de milieu sur le taux d'abattement du phénol…… 49
Figure 3.17| Évolution temporelle de la vitesse de biodégradation du phénol présent dans le

surnageant de milieu réactionnel…….. 50
Figure 3.18| Évolution temporelle du rendement de biodégradation du phénol présent dans le surnageant de milieu réactionnel…….. 50
Figure 3.19| Effet de la concentration initial du phénol sur la vitesse initial et le rendement de biodégradation de phénol ……..…… 51
Figure 3.20| Représentation graphique Lineweaver-Burk…….. 52
Figure 3.21| Influence de concentration de peroxyde d'hydrogène sur le taux d'abattement du phénol…….. 53
Figure 3.22| Influence de l'activité enzymatique total sur le taux d'abattement du phénol……. 54
Figure 3.23| Influence de nombre de billes (N) sur le taux d'abattement du phénol…….. 55
Figure 3.24| Cinétiques de disparition du phénol par la peroxydase encapsulées…….. 56
Figure 3.25| Réutilisation de l'enzyme encapsulé ……..…….. 56
Figure 3.26| Accumulation de produits polymérisés par la réaction enzymatique à l'intérieur des billes…… 57
Figure A.2.1| Courbe d' étalonnage de peroxyde d'hydrogène……. 66
Figure A.3.1| Cinétiques de disparition du phénol par la peroxydase encapsulées…….. 66
Figure A.3.2| Réutilisation de l'enzyme encapsulé…….. 67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1| Supports d'immobilisation des enzymes**……...……**…….. 28
Tableau 3.1| Liste des produits chimiques utilisés dans cette étude…….**.....** 31
Tableau 3.2| Valeurs des conditions opératoire à utiliser…….…….**.....** 37
Tableau 3.3| Valeurs des conditions opératoires…….... 48
Tableau 3.4| Conditions de la réalisation des essais de la biodégradation du phénol par les deux procédés enzymatiques……..……..... 59

ANNEXES

Annexe 1:Méthodes analytiques

A.1.1 Méthode fait pour tracerla courbe détalonnage de peroxyde d'hydrogène

- Prendre 8 tubesa essaies, dans chaque un introduire :
  - 1 ml de phénol(0,01 M).
  - 1 mlde 4-aminoantipirine (0,001M).
  - 1 mlde H_2O_2(0-0,14mM).
  - 2 mlde l'eau distillé.
- Au temps t_0, le chronomètre est déclenchée immédiatement après l'injection de 0,2 ml d'EEPPdans 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 concentrations étudiées après un rinçage soigneux de la cuve.Le coefficient d'extinction molaire ξ trouvé de l'ordre de 7425 L/mol.

A.1.2 Méthode de mesure de l'activité enzymatique

- Dans une fiole de 50 mlintroduire :
  - *1 ml de phénol (0.1M).*
  - *1 mld' H_2O_2 (0.1M).*
  - *1 ml de 4- aminoantipyrine (0.01M).*
- Compléter le volume jusqu'à trait de jauger par une solution tampon pH 6.
- Placer 4ml de mélange réactionnel préparé précédemment dans des tubes à essai.
- Ajouter 0,2 ml d'EEPP;
- Agiter par retournement entre le pouce et l'index.
- Placer rapidement le mélange réactionnel dans la cuve de spectrophotomètre.
- Lancer la cinétique, par la mesure de densité optique avec un pas de 10secondes.

Annexe 2 : Coubre d'étalonnage de peroxyded'hydrogène.

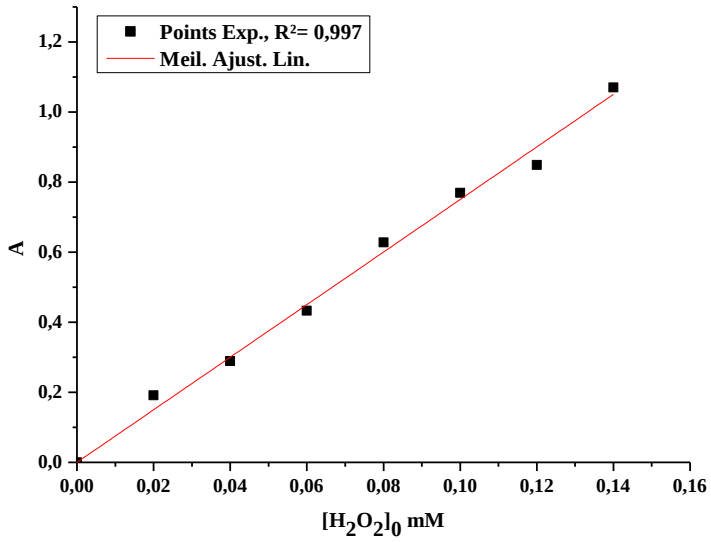


Figure A.2.1|Courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène.

Annexe 3 : Biodégradation du phénol par la peroxydase immobilisée

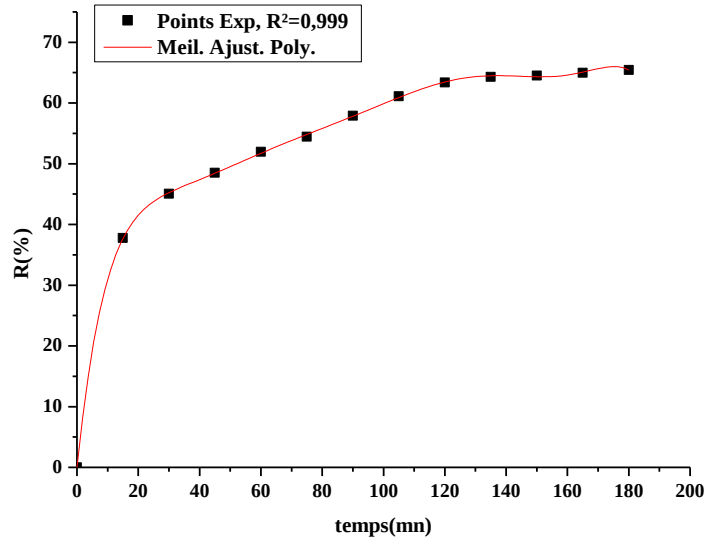


Figure A.3.1|Cinétiques de disparitiondu phénol par la peroxydase encapsulées *, [Phénol]=46 mg/l, [H_2O_2]=13 mM, pH=8, T= 40 °C, Nombre des billes=25, AE_t= 5 UI/ml,[H_2O_2]$_0$/[phénol]$_0$=27.*

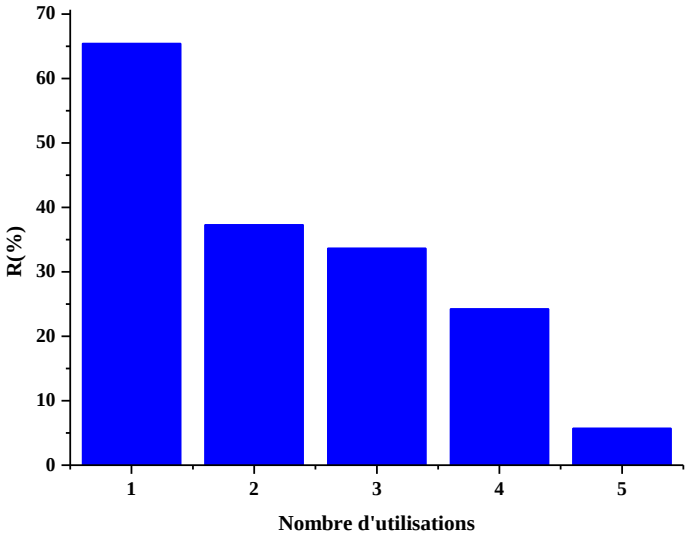


Figure A.3.2| Réutilisation de l'enzyme encapsulé, *[Phénol]=46 mg/l, [H_2O_2]=13 mM, pH=8, T= 40 °C, Nombre des billes=25, AE_t= 5 UI/ml,[H_2O_2]$_0$/[phénol]$_0$=27, temps du contact=165 mn.*

CHAPITRE 1: GÉNÉRALITÉS SUR LE PHÉNOL ET LES TRAITEMENTS DES EFFLUENTS LE CONTENANT

1.1 Introduction

Le phénol est un polluant très répandu dans de nombreux effluents industriels on le trouvedans les eaux usées des usines de transformation du charbon, des raffineries du pétrole, desindustries papetières, des usines de fabrication de résines, de peintures, de textiles, depesticides, des industries pharmaceutiques et des tanneries.

En 1650 Johann Rudolf Glauber, un scientifique allemand découvre le phénol à l'état impur àpartir de la distillation du goudron de houille. Il le décrit comme "une huile vive et rouge desang qui assèche et guérit tous les ulcères humides". Environ deux siècles plus tard sonconcitoyen Friedrich Ferdinand Runge parvient à isoler pour la première fois le phénol et il lenomme "acide carbolique".

Le phénol à cette époque est connu sous le nom d'acide phénique, d'hydroxybenzène oud'acide carbolique. Il est de la famille des alcools aromatiques il est présent dans denombreux végétaux. Il a une structure moléculaire simple (voir la figure 1.1).

Bien qu'il ait une fonction alcool, le phénol a des propriétés uniques et n'est pas classécomme un alcool. Sa structure est celle d'un groupement hydroxyle -OH lié à un atome decarbone du cycle benzénique.

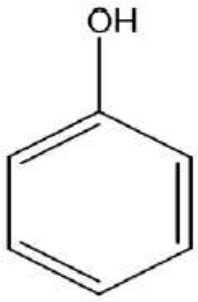


Figure1.1| Structure de la molécule de phénol.

1.2 Propriétés du phénol

Le phénol, C_6H_5OH, pur est un solide incolore cristallisé à la température ambiante. Il est hygroscopique et a une odeur âcre et douceâtre. Sa limite olfactive est égale à 0,05 $mg.L^{-1}$ **(ETSC 2008; INRS 2008)**. Au contact de l'air ou sous l'influence de l'humidité le phénol s'oxyde légèrement pour donner des traces de quinone. Il prend alors une couleur rose, puis rouge. Sa solubilité dans l'eau est limitée : 80 $g.L^{-1}$ à 25°C. Il est très soluble dans de nombreux solvants organiques tels que l'acétone, l'éthanol, l'oxyde de diéthyle. Il est facilement soluble dans l'éther **(INRS 2008)**.

1.2.1 Propriétés oxydantes

Le phénol réagit vivement avec des oxydants puissants comme les peroxydes. Vers 800°C et en présence de zinc, la molécule du phénol se réduit en benzène. À haute température, le phénol pur se décompose entièrement en oxyde de carbone, carbone et hydrogène. À chaud, le phénol liquide attaque certains métaux, tels que le plomb, le zinc, l'aluminium… et aussi certains plastiques, comme le polyéthylène **(INRS 2008)**.

1.2.2 Propriétés acido-basique

Les phénols sont plus acides que les alcools. En effet, l'ion phénolate est stabilisé par résonance et est plus stable qu'un ion alcoolate, comme indiqué sur la figure (1.2). En effet, lors de la prise du proton du groupement hydroxyle (-OH), le doublet électronique est partagé entre quatre carbones. La charge est ainsi délocalisé sur autant de carbones et l'ion est beaucoup plus stable que sur un alcool où la charge négative serait trop importante et s'approprierait le proton laissé immédiatement après.

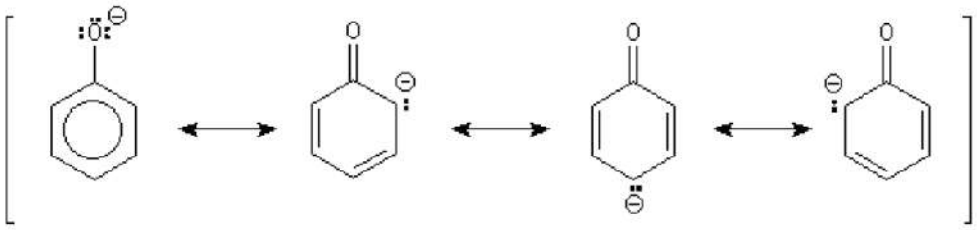


Figure1.2|Stabilité ion phénolate **(Handbook of chemistry& physics 2004)**

Cet acide est toutefois un acide relativement faible; en conséquence, sa base conjuguée, l'ion phénolate, est une base très forte. Le pKa du couple (phénol/phénolate) est 9,9 à 25°C

(Handbook of chemistry& physics 2004), selon:

$$\frac{C_{phénolate}-C_{H+}}{C_{phénol}} = 10^{-9,9} \quad \text{.....(Eq.1.1)}$$

1.2.3Propriétés spectrale

Dans le cas des phénols, la paire libre peut être conjuguée avec le système π du noyauet cela cause de nouvelles absorptions (ξ= 5000- 20000) dans la région 210-300 nm dues à untransfert de charge intramoléculaire.

Le phénol (dans l'eau) montre une bande à 270 nm (ξ= 1450) dont la correspondanteest la bande à 254 nm dans le benzène ; elle est plus intense que pour le benzène. Une autrebande est observée vers 210 nm ξ= 6200) représentant l'absorption de transfert de charge intramoléculaire. En solution basique, les phénols se transforment en ions phénates et il enrésulte un fort effet bathohyperchrome utilisable au point de vue analytique**(GUEDIRA 2005).**

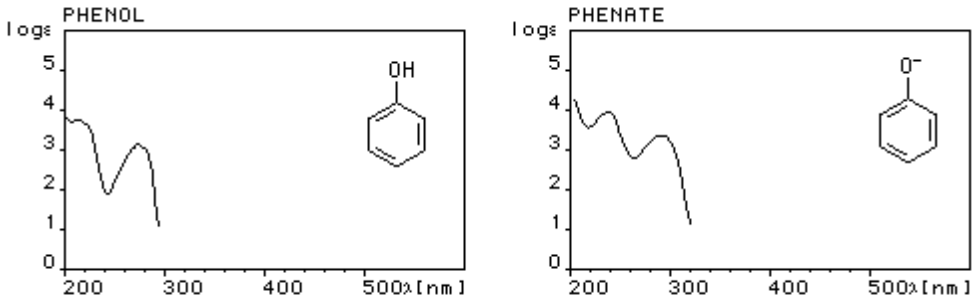


Figure 1.3| Spectre UV du phénol **(Dupuis 2012).**

1.3Toxicité et écotoxicité du phénol

Le phénol est une substance irritante et fortement corrosive. Il a une forte capacité à pénétrerdans l'organisme en traversant la peau et les muqueuses. Les systèmes cardiovasculaires etnerveux sont également des cibles.Le phénol est classé par l'Union Européenne comme mutagène catégorie 3 **(SFC 2009)**. Lamajorité des phénols et de leurs dérivés sont des substances toxiques. Beaucoup d'entre euxsont classés comme des déchets dangereux, et certains d'entre eux

sont connus ou soupçonnésd'être cancérogènes. Aussi le phénol est répertorié sur la liste prioritaire des substancesdangereuses identifiées par **(ATSDR 2007)**.

Le phénol est rapidement absorbé lors de son introduction dans l'organisme. L'absorptionpercutanée d'une solution de concentration égale à 25 $mg.kg^{-1}$ de 14C-phénol est d'environ19% pour la peau humaine **(INRS 2008)**. Après absorption, le phénol se distribue rapidementdans tout l'organisme avec des concentrations supérieures à celle du sérum dans le foie, larate, les reins et les surrénales **(INRS 2008)**. Il existe peu de données expérimentales chez lesvolontaires sains publiées dans les bases de données bibliographiques et/ou toxicologiques.

Une étude a consisté à déposer du phénol de concentrations égales à 2,5-5-10 $g.L^{-1}$ sur lesbras de personnes volontaires. Le phénol est absorbé de façon constante pendant une heureavec un flux égal à 0,08 $mg.cm^{-2}.h^{-1}$**(INRS 2008)**. L'application du phénol concentrée sur lapeau peut provoquer des lésions cutanées sévères **(ATSDR 2008)**. Il existe des casd'intoxications mortelles **(Mathieu 2002)**. L'ingestion de 5-500 mg, accidentelle ouintentionnelle est mortelle chez les nourrissons et des décès d'adultes apparaissent aprèsl'ingestion de 1-32 g **(ATSDR 2003; Barrios-Martinez et al. 2006)**.

Les vapeurs sont également toxiques. La valeur limite de la concentration admissible dansl'air est fixée pour la France à 0,0002 $mg.L^{-1}$**(ETSC 2008)**. Une quantité importante peutentrer dans la peau quand le corps est en contact avec des vapeurs du phénol. Il est ensuitetransformé en d'autres produits chimiques appelés métabolites. La plupart de ces autresproduits chimiques quittent le corps sous forme d'urines en quelques jours **(INERIS 2005;INRS, 2008)**. Lorsque de l'air contenant du phénol est respiré la plupart du phénol varapidement entrer dans le corps par l'intermédiaire des poumons et donne des signesd'irritation respiratoire avec toux et dyspnée. Un œdème pulmonaire retardé, de mécanisme non élucidé est habituel **(INRS 1997; ETSC2008)**. Après 6 heures d'exposition à des vapeurs de phénol à des concentrations comprises entre 1,6 et 5,2 $mg.m^{-3}$, le phénol est absorbé de 70 à 80% **(INERIS 2005)**. Chez l'homme, lors d'une exposition par inhalation à des vapeurs du phénol à des concentrations comprises entre 6 et 20 $mg.m^{-3}$, 60 à 80% de phénol sont absorbés **(INRS 2008)**. Quand du phénol est inhalé, différents symptômes apparaissent : une soif intense, des vomissements, une respiration profuse, une hypotension, des nausées, des douleurs abdominales, des diarrhées, une hémolyse, une cyanose, des convulsions et dans certain cas, un coma **(ETSC 2008)**. Il existe une étude récente de l'exposition par inhalation des animaux au phénol **(ATSDR2009)**, Dans cette étude, des rats ont

respiré seulement de façon intermittente des concentrations allant jusqu'à 0,103 mg.L^{-1}pendant 2 semaines. Aucune altération macroscopique ou microscopique des tissus et des organes principaux, y compris la cavité nasale n'est constatée. D'autres études chez l'animal montrent que l'exposition au phénol contenu dans l'air peut causer une pneumonie, des altérations morphologiques du myocarde, du foie et des reins **(ATSDR 2009)**. De plus, des animaux exposés à de fortes doses meurent en 5 à 150 minutes **(INRS 2008)**.

Les études sur le phénol et ses dérivés révèlent qu'ils sont toxiques et très dangereux pour la vie aquatique **(Pan et Kurumada2008)**. Le phénol présent dans l'environnement conduit à de nombreux effets indésirables sur l'environnement et sur la santé. Il peut notamment modifier les écosystèmes aquatiques et causer des dommages aux ressources précieuses **(Babich et Davis1981; Huang et al.2007)**. De plus, le phénol présent dans l'eau ou dans des aliments entre rapidement dans l'organisme par le tube digestif. Il est ensuite rapidement distribué dans tous les tissus et exerce une action corrosive. Les organes cibles sont le cerveau et les reins **(INERIS 2005)**.

En raison de sa forte toxicité dans l'eau, il est nécessaire de traiter les solutions aqueuses du phénol, avant de les rejeter dans le milieu naturel.

La faune et la flore sont les principales cibles des effluents industriels contenant du phénol .Le phénol est un produit répandu et très toxique dans l'eau, des polluants du sol et la vie aquatique. Les composés phénoliques sont solubles dans l'eau et très mobiles et sont donc susceptibles d'atteindre sources d'eau potable en aval des rejets, où, même à faibles concentrations, ils peuvent causer de graves odeur et un goût désagréables et posent desrisques pour les populations même à une faible concentration **(Adak et Pal 2006; Huang et al. 2008)**.

USEPA recommande une limite maximale autorisée de 0,001 mg.L^{-1}**(Mohanty et al. 2005)**.

La limite générale norme de rejet des effluents du phénol est de 0,05 mg.L-1, avantd'être déversés dans les cours d'eau **(Mohanty et al. 2005)**. L'Organisation mondiale de laSanté a donc limité la concentration du phénol dans l'eau potable à 0,001 mg.L^{-1}**(Barrios-Martinez et al., 2006)**. L'Union Européenne impose une concentration totale du phénolinférieure à 0,0005 mg.L-1 dans l'eau potable **(Jiang et al. 2003)**. En France la concentrationen phénols, doit être inférieure ou égale à 0,1 mg.L^{-1}. Les expositions au phénolpeuvent êtrenombreuses : soit au contact de milieux naturels, soit en consommant de l'eau ouune denrée alimentaire contaminée, soit en utilisant des produits de consommation contenantdu phénol **(Vasu 2008)**. La bioaccumulation du phénol

d'une concentration de 2 $mg.L^{-1}$ouplus dans l'environnement aquatique peut déjà provoquer des effets secondaires sur ledéveloppement de certains poissons et des concentrations entre 10 et 100 $mg.L^{-1}$ entraînentla disparition de la vie aquatique dans les 96 heures **(Huang et al. 2007; Huang et al. 2008)**.

Lorsque cet effluent est rejeté dans l'environnement sans traitement préalable, il provoque degraves dommages par contamination du sol, de la surface et des eaux. Des législations ontdonc été mises en place pour réguler la teneur en phénol des eaux résiduaires. Ainsi, pourl'Agence de Protection Environnemental des Etats-Unis, la limite maximale acceptable de laconcentration du phénol dans les eaux usées est estimée à moins de 1 $mg.L^{-1}$**(Huang et al. 2007; Huang et al.2008)** afin de protéger la santé humaine contre les effets toxiquespotentiels causés par l'exposition au phénol. Cependant le phénol est rapidement métabolisépar les poissons et ces résultats indiquent une rétention de certains métabolites du phénol**(INERIS 2005)**.

1.4Les méthodes de production du phénol

Bien que le phénol présent dans l'environnement peut-être extraie des goudrons ou des eauxrésiduaires des unités de craquage, il est produit en majeure partie de manière synthétique.Industriellement le phénol est produit par plusieurs méthodes. Un procédé plus ancienconsistait à effectuer la fusion alcaline d'un sel d'acide sulfonique **(Perrin et Scharff 1993)**.

Cette réaction nécessite l'utilisation de la soude très concentrée et une température élevée;c'est pourquoi elle est peu utilisée. L'autre méthode est une chloration catalytique suivie d'une hydrolyse basique du chlorobenzène obtenu **(Mathieu 2002; Perrin et Scharff 1993)**.

Une méthode appelée DOW consiste à oxyder le toluène et à former de l'oxyde benzoïque puis à procéder à une décarboxylation oxydante donnant le phénol **(Perrin et Scharff 1993;INERIS 2005)**. Cependant la principale méthode de production du phénol est celle mise aupoint par Hock et Lang en 1944 **(Perrin et Scharff 1993)**. Elle est exploitée depuis les années50 **(SFC, (2009);Kujawski et al. (2004 a, b))**. Cette méthode consiste à oxyder le cumène ouL'isopropyl benzène par l'oxygène de l'air à une température comprise entre 90 et 130°C, sousune pression de 5 à 10 bars, en phase liquide et à un pH d'environ 9,5. Elle conduit à former l'hydro peroxyde de cumyle comme indiqué sur la figure (1.4). Plus de 85% de phénol sont Produit par cette méthode.

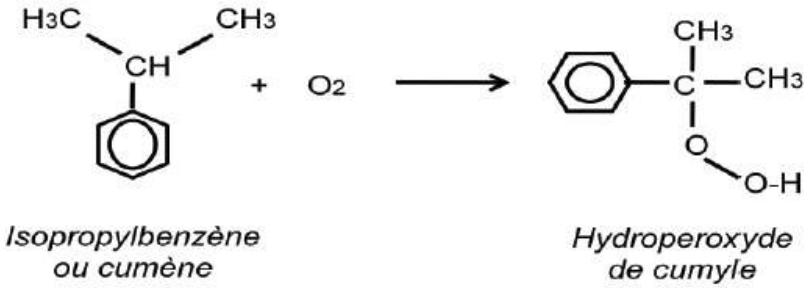


Figure1.4|Oxydation du cumène**(SFC 2009;Kujawski et al. 2004 a, b).**

L'hydroperoxyde de cumyle se décompose à une basse température grâce à un catalyseuracide donnant le phénol et l'acétone, selon la réaction suivante:

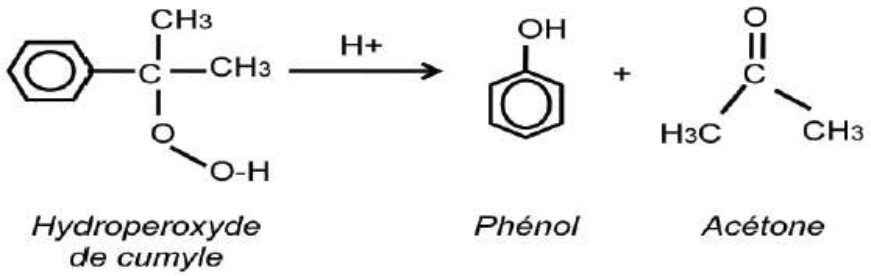


Figure 1.5|Décomposition de l'hydropéroxyde de cumyle**(SFC, 2009;Kujawski et al. 2004 a, b)).**

Dès 1889 le phénol est synthétisé et manufacturé par le groupe BASF. La production mondiale dans les années 1990 est de l'ordre de 3,5 Mt**(Perrin et Scharff 1993)**.

1.5 Effluents riches en composés phénoliques

Les composésphénoliques se retrouvent dans plusieurs types d'effluents **(Sponza 2003)**surtout dans les effluents issus des industries pharmaceutiques, de matières plastiques, de fibres synthétiques (polyamides, etc.), de raffinage du pétrole, de détergents, de pesticides et insecticides (chlorophénols, etc.), de colorants et textiles **(Cristóvão et al. 2008;Peralta-Zamora et al.2003;Svobodova et al. 2008)** d'additifs pour l'huile, de fabrication de l'huiled'olive **(D'Annibale et al. 2000;Rubia et al. 2008;Iamarino et al. 2009;Jaouani et al.2006;Roig et al. 2006;Scioli et al. 1997; Toscanoet al. 2003)**, ainsi que des usines de production d'acier, de charbon et de résine **(Stapleset al. 1998)**. On les trouvéeségalementdans des effluents issus de

papeterie , des effluents domestiques, des effluents d'origineagricole ou mêmedans des fumées issues de la combustion du bois **(Cohen et al. 2009)**.

Les concentrations en composés phénoliques dans les effluents industriels peuvent varier de quelques microgrammes à quelques grammes par litre d'effluents selon leur origine. On retrouve ainsi les effluents issus des industries de production d'huile d'olive (jusqu'à 5000 $mg.L^{-1}$selon Iamarino et al. **(Iamarino et al. 2009)**, dans les effluents des cokéfactions (de 28 à 3900 $mg.L^{-1}$), des industries pétrochimiques (de 9 à 1220 $mg.L^{-1}$), des industries pharmaceutiques, de matières plastiques, de bois, de peinture et de papier **(Busca et al. 2008)**(de 0,1 à 1600 $mg.L^{-1}$**)** et les effluents issus des raffineries (de 6 à 500 $mg.L^{-1}$)

1.6 Différentes voies de dégradation des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont éliminés des effluents par des procédés de séparation (voie physique) ou procédés visant leur dégradation (voies chimique ou biologique) **(Busca et al. 2008)**. La réaction de dégradation des composés phénoliques par voie biologique peut impliquer soit des micro-organismes (cellules vivantes), soit des enzymes.

1.6.1 Élimination par voie physique

Les composés phénoliques peuvent être éliminés des effluents liquides par adsorption, absorption, filtration membranaire, pervaporation, ou encore par distillation avec entrainement par la vapeur **(Busca et al. 2008)**.

Parmi ces différentes méthodes physiques, la séparation par adsorption sur charbon actif est la plus utilisée du fait de sa simplicité. Toutefois cette méthode est peu sélective, elle permet l'élimination non seulement des matières organiques mais aussi des matières inorganiques. Son efficacité dépend du type de polluants et de la structure du charbon actif, notamment de sa porosité. Le charbon actif est obtenu à partir de matériaux amorphes à base de charbon suite à la mise en œuvre de réactions de carbonisation (800°C) et d'activation (800°C-1000°C), la porosité du matériau et donc sa capacité d'adsorption étant améliorées par une augmentation de la température de traitement **(Rageul 1991;Zumriye et al. 2001)**. La quantité de polluant adsorbé est fonction de la concentration en polluant (d'autant plus grande que cette concentration est élevée), elle augmente avec l'augmentation du temps de contact, la diminution du pH et de la température **(Busca et al. 2008;Kennedy et al.2007)**. L'adsorption par charbon actif peut être mise en œuvre en lit fixe ou en lit fluidisé **(Charinpanitkul et al. 2010)**.

Cependant, malgré les avantages liés à la simplicité de la mise en œuvre de la méthode, cette technique de dépollution reste coûteuse. En effet après utilisation, les charbons ne peuvent pas être rejetés dans l'environnement, ils doivent être régénérés par voie thermique à très hautes températures**(Busca et al.2008)**.

1.6.2 Dégradation par voies chimiques

Il est possible d'envisager l'oxydation directe des composés phénoliques par l'oxygène dissous en conditions extrêmes de température (>200°C), de pression (> 3 MPa) et si possible en présence de catalyseurs (généralement des cations métalliques de transition tels des ions Cu, ou Fe). Cependant cette voie est coûteuse en énergie et nécessite des équipements adaptés. De plus l'oxydation n'est jamais totale ; l'objectif recherché est d'obtenir des molécules organiques qui pourront ensuite être dégradées par voie biologique **(Busca et al. 2008)**.

Afin de réduire la température et la pression de réaction, on a recours à l'utilisation d'oxydants chimiques plus puissants que l'O_2 à savoir l'ozone (O_3) dont le potentiel de réduction est élevé (E° = 2,07 V) ou le peroxyde d'hydrogène (H2O2) (E° = 1,78 V). La dégradation des composés phénoliques peut être améliorée par la mise en œuvre de procédés d'oxydation photocatalytiques en présence de TiO2 **(Morawski et al.2004), Negishi et al. 2008))** ou électrochimiques dont le procédé électro-Fenton utilisant du chlore et de l'hypochlorite de sodium **(Guohua 2004).**

Différentes configurations de réacteur sont possibles. On retrouve dans la littérature des procédés utilisant l'ozone en couplant à un réacteur biologique mettant en œuvre la souche Phanerochaetechrysosporium **(Kunz A. et al. 2001)** à l'action des ultra-violets (UV)**(Tawabini et al.2011)**à l'utilisation de gel de silice et de zéolite **(Sanoet al. 2007)**,ou encore à l'adsorption sur charbon actif**(Charinpanitkul et al. 2010)**.

Chen et al.**(Chen.et al. 2009)**,ont couplé un réacteur dédié à la dégradation du phénol en présence de peroxyde d'hydrogène à une unité de filtration sur membrane céramique pour séparer des polymères de la réaction.

Malgré tous leurs intérêts, ces procédés oxydatifs par voie chimique peuvent parfois engendrer des produits secondaires plus toxiques que le produit originel. Par exemple, l'utilisation du chlore pour dégrader du phénol est effective mais susceptible de conduire à la formation des composés aromatiques chlorophénols hautement toxiques **(Throop 1975)**.

1.6.3 Dégradation par des micro-organismes

Des champignons, certaines bactéries et levures sont capables de métaboliser des composés phénoliques **(Galindez-Mayer et al. 2008;Stoilova et al. 2006 et 2007)**.

Parmi les micro-organismes les plus intéressants, on retrouve les moisissures et les levures **(Luke et al. 1996 ;Scioli et al. 1997; Stoilova et al.2006 et 2007)**.

Par exemple, Neurospora crassa est un champignon filamenteux capable de produire 2 oxydoréductases différentes (une laccase et une polyphénol-oxydase). Ce micro-organisme a été utilisé avec succès par Luke et Burton**(Luke et al. 2001)** pour traiter un effluent contenant des phénols (i.e. du p-cresol et du phénol). Ces auteurs ont comparé les performances d'un bioréacteur à membrane à celle d'un réacteur batch et ont montré que les résultats obtenus avec le réacteur à membrane étaient plus intéressants.

Des champignons macroscopiques de pourriture blanche ont été utilisés en batch et en lit fixe pour la dégradation du phénol et du 2,4,6-trichlorophénol (concentration initiale de 800 et 85 $mg.L^{-1}$ respectivement)**(Ehlers et al. 2005).**

Les micro-organismes ne présentent pas la même affinité vis-à-vis de tous les substrats. Stoilova et al.(Stoilova et al ;(2006)),ont montré que les capacités de dégradation du mycélium d'Aspergillusawamori variaient selonla nature du composé phénolique. Ce champignon est capable de dégrader à 100%, une solution à 1 $g.L^{-1}$de catéchol en 3 jours, dans le même temps il peut dégrader à 100%, une solution à 0,6 $g.L^{-1}$de phénol et à 60% seulement une solution à 1 $g.L^{-1}$de phénol. L'augmentation de la concentration en phénol entraine une diminution de la vitesse de dégradation. la méthode de dégradation des composés phénoliques par voie biologique est intéressante en raison de la production continue des enzymes oxydatives couplée à la production de biomasse **(Luke et al. 2001)**. Cependant, comme les composés phénoliques présentent des effets antimicrobiens **(Capasso et al. 1995 ;El Hajjouji et al. 2007)** et l'utilisation des microorganismes est limitée au traitement d'effluents dilués**(Borja et al. 1997)**.

1.6.4 Dégradation par des enzymes

L'utilisation d'enzymes microbiennes au lieu de cellules entières est une alternative intéressante puisque l'on s'affranchit ainsi des problèmes liés à la toxicité des composés phénoliques vis-à-vis des organismes vivants **(Capasso et al. 1995;El Hajjouji et al. 2007).**

En outre, la catalyse enzymatique présente des avantages par rapport à la catalyse chimique en raison des excellentes sélectivités et spécificité des enzymes **(Mateo et al. 2007)**.

De plus, les récents progrès en biotechnologies qui permettent la production d'enzymes en grande quantité et à moindre coût **(Karam et al. 1997)**de même que l'utilisation d'enzymes sous forme immobilisée dans un réacteur approprié qui améliore la stabilité et permet l'allongement de la durée de vie du biocatalyseur**(Duran al. 2000); Karam et al. 1997)** ont renforcé ces dernières années, l'intérêt des scientifiques et des industries pour les procédés mettant en œuvre des enzymes.

Il existe 2 principaux types d'enzymes capables de catalyser les réactions de dégradation des contaminants phénoliques : les peroxydases et les polyphénol-oxydases **(Duran et al.2000; Edwards et al. 1999;Karam et al.1997)**.

1.7Conclusion

Les trois voies de dégradation des composés phénoliques (physique, chimique et biologique) ont leurs points forts et leurs limites. L'adsorption sur charbon actif permet d'éliminer des polluants à la fois organiques et inorganiques, mais elle est coûteuse du point de vue de la régénération du charbon actif.

La voie chimique permet une oxydation directe, mais son coût d'opération et d'investissement est élevé. Elle peut parfois conduire à des produits de réaction encore plus toxiques que le substrat initial.

Pour la voie biologique, l'utilisation des cellules entières de microorganismes permet de travailler en conditions douces de température et de pression tout en garantissant la production continue des oxydases. La limite de ce procédé repose sur le fait que les microorganismes sont inhibés par des composés phénoliques à fortes doses dans les effluents. Le procédé enzymatique, quant à lui, représente une alternative intéressante. Parmi différentes enzymes actives, qui utilisent seulement l'oxygène dissous dans l'eau pour faire le transfert d'électron, apparait comme la plus attractive.

CHAPITRE 2 : BIOPROCÉDÉSENZYMATIQUES

2.1 Introduction

La pollution de l'eau par les composés phénoliques est causée principalement par une forte industrialisation qui rejette ces polluants toxiques dans l'environnement. Pour neutraliser ces polluants, une technique très prometteuse et efficace qui est simple et peu coûteuse se reflète dans le traitement biologique de ces effluents. Cette méthode d'élimination qui est la biodégradation consiste à utiliser des enzymes qui ont la capacité de dégrader le polluant etdonc de le métaboliser en substances non toxiques grâce à des réactions biochimiques.

Cette partie bibliographique se limite donc au rappel sur les propriétés fondamentales des enzymes et de la cinétique enzymatique d'une enzyme en solution aqueuse.

2.2 Définition des enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques capables de réaliser la plupart des réactions biochimiques avec une efficacité extraordinaire. Les réactions chimiques dans les systèmes biologiques se font rarement en l'absence d'enzymes. L'activité de ces enzymes est souvent régulée. D'autre part, une enzyme ne favorise pas seulement une réaction chimique donnée, elle empêche aussi la présence de réactions secondaires gênantes.

Au cours de ces dernières années, le nombre d'enzymes connues a considérablement augmenté et les applications sont multiples en chimie analytique, en pharmacologie, en toxicologie, dans l'industrie agro-alimentaire et dans le secteur biomédical **(Tran-Minh 1991)**.

2.3 Classification et nomenclature

On trouve encore, à l'heure actuelle, la dénomination ancienne de certaines enzymes telle que trypsine ou pepsine. Cependant, dans la mesure où l'on s'intéresse moins à la nature qu'à la fonction de l'enzyme, on utilise plutôt la nomenclature suivante :

L'Union Internationale de Biochimie recommande l'utilisation du suffixe « ase » couplé parfois avec le substrat (uréase, phosphatase...), mais généralement avec le type de réaction catalysée (hydrolase, oxydase, isomérase...).

Chaque enzyme porte ainsi un numéro dont le premier chiffre correspond à un certain type de réaction catalysée :

- **Transférases** (qui catalysent le transfert de groupements fonctionnels)
- **Hydrolases** (qui catalysent des réactions d'hydrolyse)

- **Lyases** (qui catalysent des réactions d'addition sur une double liaison)
- **Isomérases** (qui catalysent des réactions d'isomérisation)
- **Ligases ou synthétases** (formation des liaisons avec clivage de l'ATP).
- **Oxydoréductases** (qui catalysent des réactions d'oxydoréduction, exemple :*Peroxydases*).

Le nom de l'enzyme ainsi que son numéro dans sa classification ne sont pas toujours suffisants pour caractériser sa spécificité té et son pouvoir catalytique. Selon la source dont elle est extraite, l'enzyme possède une séquence d'aminoacides particulière et des propriétés différentes : la peroxydase(Turnip Peroidase) utilisée dans cette étude provient de Radis blanc.

2.4 Structure des enzymes

On a réussi jusqu'à maintenant à identifier plusieurs milliards d'enzymes, un grand nombre d'entre elles ont été cristallisées. Ce sont toutes des protéines. Les unités structurales de base sont donc des aminoacides. Ces aminoacides sont unis par des liaisons peptidiques pour former des chaînes polypeptidiques.

$$H_3N^+\text{-}CHR_1\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CHR_2\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CHR_3\text{-}CO\text{-}.....\text{-}NH\text{-}CHR_n\text{-}COO\text{-}\ldots.(Eq.2.1)$$

Les groupements R possèdent souvent des fonctions NH_2 ou COOH permettant leur immobilisation par liaisons covalentes sur des supports insolubles.

La spécificité de l'enzyme est souvent attribuée à sa structure tridimensionnelle très élaborée permettant la formation du site actif responsable de la catalyse enzymatique**(Fabiano 2002)**.

2.5 Notion du site actif

C'est une région particulière de l'enzyme au sein de laquelle se déroule la réaction enzymatiqueproprement dite. Le site actif a une taille restreinte par rapport à la taille globale de la protéine.Il consiste d'au moins deux parties fonctionnelles, qui peuvent ou non être voisines sur la chaîne polypeptidique (si non, la structure tertiaire les amène près l'une de l'autre)**(Augère2001).**Ce site comporte :

- **Un site de reconnaissance**: reconnaissance et maintien du substrat avec des liaisons faibles (constitué de certains acides aminée).
- **Un site catalytique :** est constitué des résidus qui sont directement impliqués dans la formation et rupture des liens chimiques. Ces résidus sont souvent localisés dans le

fond de la cavité, et dans la majorité des cas, possèdent des chaînes latérales ioniques ou réactives (ex. His, Lys, Cys, Ser, Asp, Glu), **(Augère 2001).**

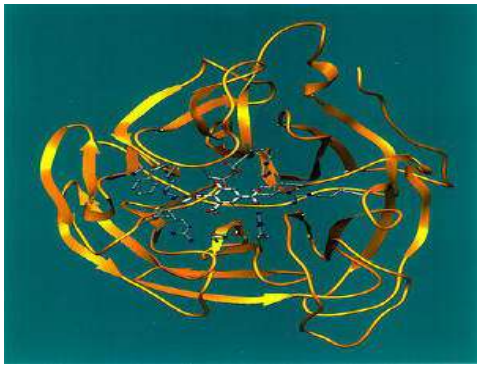


Figure2.1|Localisation du site actif**(Safa chaouche et Guerromi 2010).**

Deux modèles pour expliquer la spécificité des enzymes:

Clé-serrure*:*la forme du site actif est complémentaire à celle du substrat

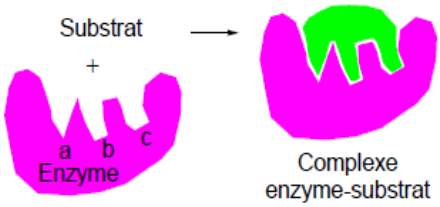


Figure 2.2|La forme clé-sérrure**(Safa chaouche et Guerromi 2010).**

Forme induite: l'enzyme change sa conformation lors de la liaison du substrat (suppose que l'enzyme a une structure flexible)**(Safa chaouche et Guerromi 2010).**

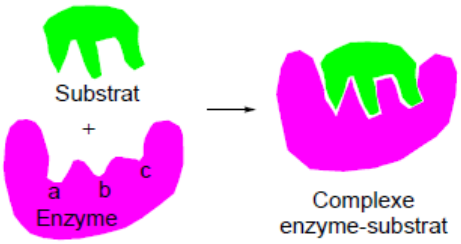


Figure 2.3| La forme induite**(Safa chaouche et Guerromi 2010).**

2.6Unités d'activité

L'IUPAC (International Union of Pure and AppliedChemistry) et l'IUB (International Union of Biochemistry) recommandent l'adoption d'une unité internationale:**U.I**.

L'unité internationale 'UI' est définie comme la quantité d'enzyme qui transforme une micromole (1 mM) de substrat par minute. L'unité d'activité doit être donnée à partir de mesures de vitesse initiale afin de limiter les phénomènes de dénaturation, d'inhibition ou de réversibilité, dus aux produits de la réaction. Les conditions de mesure (pH, température....) doivent être précisées bien que la température de 25°C soit généralement adoptée.

Généralement, la détermination de l'activité se fait dans les conditions de saturation de l'enzyme par son substrat.

L'unité d'activité spécifique est celle relative à une unité de masse ou une mole d'enzyme. Elle peut être exprimée, par exemple, en micromoles de substrat transformé par minute par milligramme d'enzyme **(Dixon et Webb 1971)**.

2.7 Cinétique enzymatique

Les valeurs de la constante de Michaelis K_M et de la vitesse maximale V_M d'une enzyme peuvent, d'emblée, fournir certains renseignements sur son activité, bien qu'il faille avant tout tenir compte du nombre de molécules d'une enzyme disponibles dans une cellule pour savoir quelle sera l'efficacité de son action. La constante de Michaelis permet de savoir quel est le degré d'adaptation de l'activité de l'enzyme à la concentration habituelle de son substrat dans la cellule. Pour la plupart des enzymes, K_M est approximativement égale à la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat. Quand elle est élevée, cela signifie que la fixation du substrat sur l'enzyme est faible. Quand elle est basse, cela veut dire que l'affinité du substrat pour l'enzyme est forte. Pour les concentrations en substrat inférieures ou égales à K_M, la vitesse de la réaction dépend de la vitesse d'association entre enzyme et substrat**(Fabiano 2002)**.

2.7.1Equation de Michaelis-Menten

La réaction enzymatique peut être représentée sous la forme simplifiée suivante :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\longleftrightarrow}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P \quad \text{.....(Eq.2.2)}$$

*Avec:*E : enzyme; S : substrat ; P : produit ; ES : complexe enzyme-substrat.

La vitesse *v* de formation du produit est :

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES] \quad \text{(Eq.2.3)}$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}[E].[S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES] \quad \text{(Eq.2.4)}$$

Si $[E]_0$ représente la concentration initiale en enzyme, on a :

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad \text{(Eq.2.5)}$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}\{[E]0.[ES]\}[S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES] \quad \text{(Eq.2.6)}$$

D'autre part :

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{+1}[E][S] - K^{-1}[ES] \quad \text{(Eq.2.7)}$$

Avec les conditions initiales ($[S]_{t=0} = S_0$, $[ES]_{t=0} = 0$), la résolution par ordinateur de ces équations permettent de connaître l'évolution de la concentration des différentes espècesparticipant à la réaction**(Fabiano 2002)**.

On peut voir sur (la figure 2.4) que la concentration de ES se stabilise au bout d'untemps très court, ce qui permet de supposer l'établissement rapide d'un état quasi stationnaire.

Cette hypothèse est valable seulement si $[E]_0 << [S]_0$.

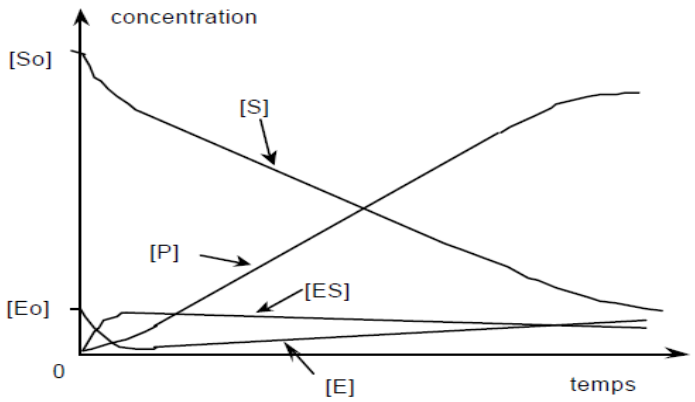


Figure2.4|Evolution de la concentration des espèces réagissantes pour $K_{+1} \approx K_{-1} \approx K_{+2}$**(Fabiano 2002)**.

Avec l'approximation de l'état quasi stationnaire de Briggs et Haldane, on a : $[ES]$ = constante, soit $\frac{d[ES]}{dt} = 0$

On en déduit :

$$[ES] = \frac{k_{+1}[E]_0[S]}{k_{+1}[S] + k_{-1} + k_{+2}} \quad \text{.....(Eq.2.8)}$$

La vitesse de réaction est alors donnée par l'équation de Michaelis-Menten :

$$V = V_M \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad \text{.....(Eq.2.9)}$$

Avec : $V_M = k_{+2}[E]_0$ et $K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$.

Où :

K_M est la constante de Michaelis de l'enzyme

V_M est la vitesse maximale de la réaction enzymatique

La représentation graphique de l'équation (2.8) permet de décrire le comportement cinétique de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat spécifique (figure 2.5).

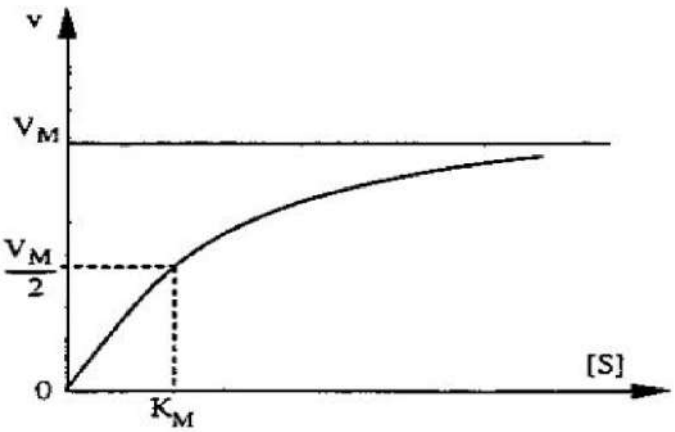


Figure2.5|Représentation graphique d'une cinétique michaélienne **(Fabiano 2002)**.

La détermination graphique directe de V_M et K_M n'est pas toujours très précise, et d'autres méthodes ont été proposées. Elles reposent sur une linéarisation de l'équation (2.9) de Michaelis-Menten. En prenant l'inverse de la vitesse on obtient : $1/V = K_M/V_M \cdot 1/[S] + 1/V_M$

Cette écriture de l'équation de Michaelis-Menten est appelée représentation de Lineweaver-Burk. La représentation graphique $1/V = f(1/[S])$ est une droite de pente K_M/V_M (voir la figure 2.6)

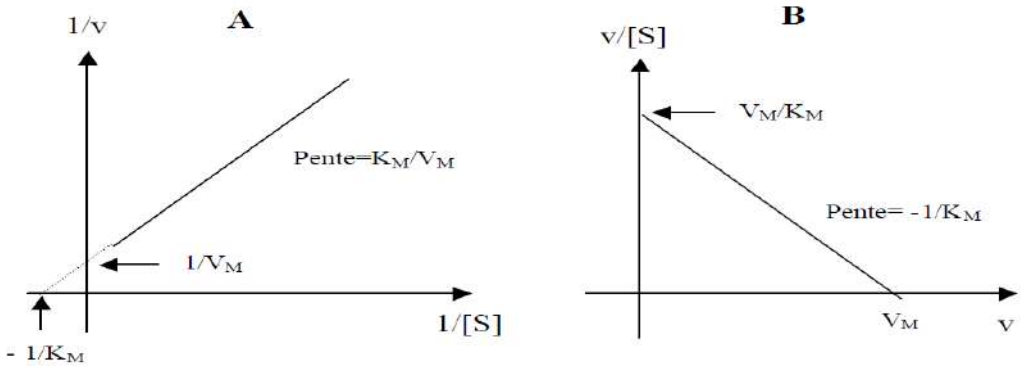


Figure2.6| Représentation graphique de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten**(Fabiano 2002)**.

2.7.2 Facteurs influençant la vitesse d'une réaction enzymatique

2.7.2.1 Effet de la température

La vitesse des réactions chimiques augmente généralement avec la température en raison de l'énergie cinétique fournie aux molécules pour augmenter le nombre de collisions efficaces conduisant aux produits de réaction. Cependant, pour les enzymes dont la structure tertiaire, très ordonnée et complexe, est nécessaire à la fixation stéréospécifique du substrat, l'élévation de la température peut détruire cette structure conduisant à la perte d'activité enzymatique.

L'activation par la température d'une réaction enzymatique s'accompagne toujours du phénomène de dénaturation thermique irréversible. Il existe une température optimale qui permet d'obtenir une vitesse constante pendant toute la durée de l'expérience. Il en résulte l'existence d'une température critique Tc, au-delà de laquelle il se produit le phénomène de dénaturation (voir la figure 2.7)**(Borel et al. 1987)**.

D'autre part, la résistance de l'enzyme vis-à-vis de la dénaturation thermique dépend d'autres paramètres tels que le pH ou la force ionique et de la présence de ligands. La fixation du substrat protège généralement l'enzyme. Les enzymes de faible masse moléculaire portant une seule chaîne polypeptidique et des liaisons disulfures sont plus sensibles à la dénaturation que les enzymes à grande masse moléculaire. En général, elles sont plus stables dans l'extrait brut en présence d'autres protéines ou immobilisées à l'état insoluble.

La dénaturation est souvent très sensible dès 50°C à 60°C. En général, il est conseillé de travailler environ 10°C en dessous du seuil de dénaturation**(Fabiano 2002)**.

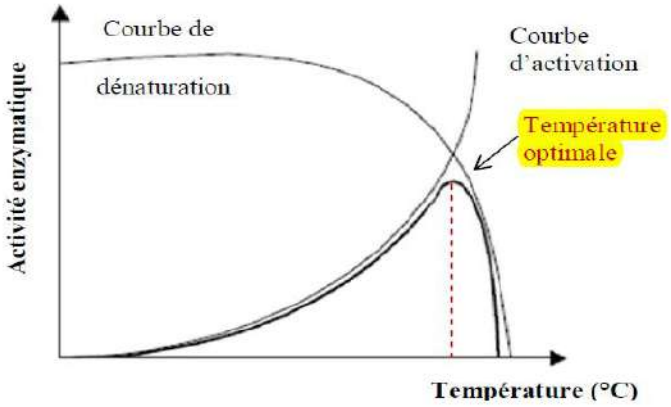


Figure 2.7| Influence de la température sur la vitesse d'une réaction chimique, **(Borel et al. 1987)**.

2.7.2.2 Effet du pH

La plupart des enzymes sont actives dans un domaine limité de pH. On peut attribuer ce fait à la stabilité de la protéine enzymatique dans une certaine zone de pH. Le pH optimal est fonction du site actif, de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. L'effet du pH sur l'activité enzymatique est lié souvent à l'état d'ionisation, soit du substrat (dont une forme seulement est catalysée), soit d'un certain nombre de groupements dissociables de l'enzyme nécessaires pour maintenir la conformation du site actif et participant à l'élaboration du complexe ES. Les différents groupements dissociables pouvant être présents au niveau du site actif sont : a-COOH carboxyle ou a-NH_2 amine en bout de chaîne, NH imidazole de'histidine, NH guanidine de l'arginine, SH sulfydryl de la cystéine et OH phénolique de la tyrosine. La valeur des pK_a de ces groupements dépend beaucoup de leur environnement polaire ou non polaire. Dans la pratique, le pH optimal est choisi aussi en fonctiondes conditions de mesuredontun compromis est nécessaire surtout lorsqu'une séquence des réactions enzymatiques est mise en jeu **(Fabiano 2002)**.

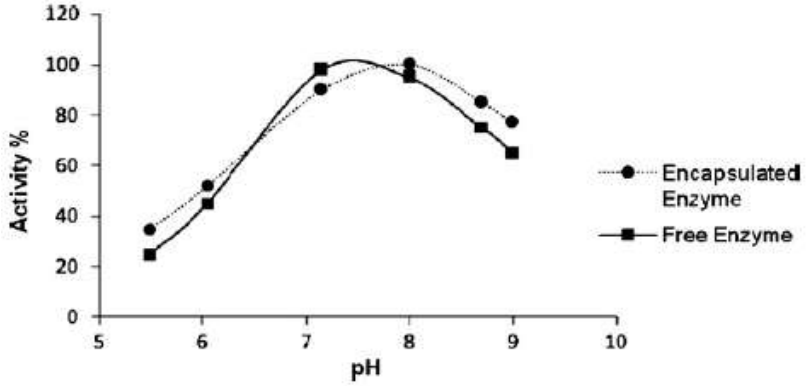


Figure 2.8| Effet de pH sur la vitesse de la réaction,**(Alemzadeh et Nejati 2009)**.

2.7.2.3 Effet de la force ionique

L'influence de la force ionique sur la vitesse d'une réaction enzymatique provient à la fois de la nature des sels choisis pour effectuer des solutions tampons et de la modification de la force ionique due à leur présence. Pour différencier ces deux effets, on utilise au moins deux tampons différents. Une même enzyme peut avoir une activité plus grande en milieu tampon citrate qu'en milieu tampon acétate au même pH. La différence vient du fait que le citrate chélate les ions métalliques présents qui pourraient inhiber l'enzyme.

La présence des sels peut aussi affecter la vitesse d'une réaction enzymatique, soit par déplacement de l'équilibre de formation du complexe activé, soit par leur combinaison avec les réactants. Pour obtenir des résultats reproductibles, la force ionique du système ne doit pas varier de façon appréciable **(Fabiano 2002)**.

2.8 Peroxydases

Les peroxydases sont des oxydoréductases, produites par certains types de microorganismes et de plantes. Elles catalysent l'oxydation d'une variété de composés phénoliques comme les phénols, les bi-phénols, l'aniline, les benzidines et des composés hétéro-aromatiques. Pour cela, elles ont besoin de la présence du peroxyde d'hydrogène comme on peut le voir d'après le mécanisme réactionnel présenté sur (voir la la figure 2.9). Les produits intermédiaires, généralement des radicaux se transforment rapidement par polymérisation non enzymatique en composés insolubles, susceptibles de précipiter et pouvant ainsi être séparés de l'effluent par filtration ou sédimentation **(Gomez et al 2006, Karam et Nicell 1997)**.

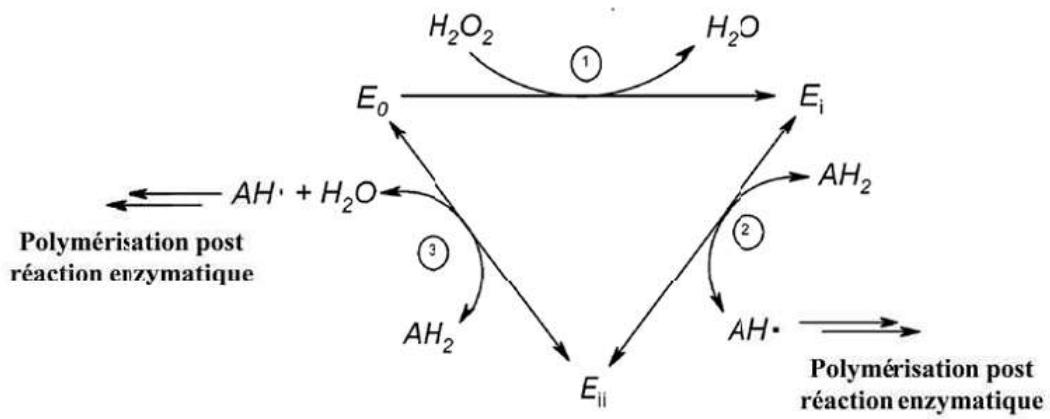
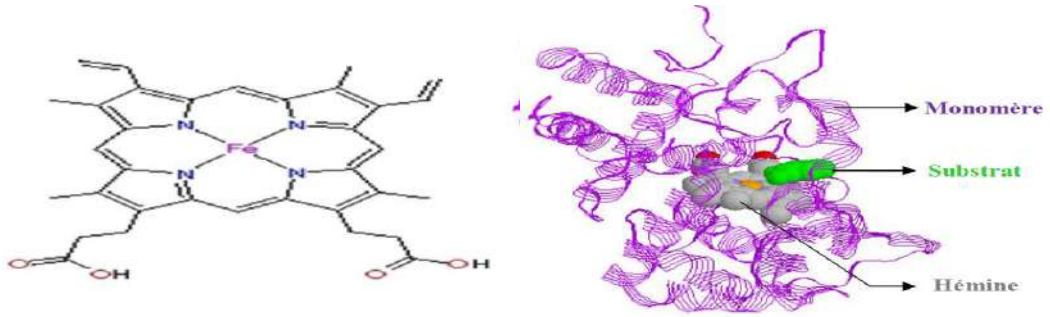


Figure 2.9|Représentation schématique du mécanisme réactionnel de la peroxydase de raifort(AH_2 : composé phénolique AH^* :radical phénoxy)**(Gomez et al 2006, Karam et Nicell 1997)**.

2.8.1 Structure de la peroxydase

La peroxydase est une protéine héminique c'est-à-dire qu'elle contient une partie non protéique plane l'hème (Figure 2.10), caractérisée par la présence d'un Fe (III) au centre d'une porphyrine et qui est en mesure de catalyser une série de réactions oxydatives **(Peter et Brien 2000)**.



(a) (b)

Figure 2.10|Structure général du peroxydase**(Ahmadi 2010),**

(a) :Structure de *l'hémine; (b) : Exemple d'un strucure de la peroxydase de raifort (HRP).*

D'après la littérature **(Duran et Esposito 2000 ; Karam et Nicell 1997),** il existe différents types de peroxydases susceptibles d'être utilisées pour le traitement des composés phénoliques parmi lesquelles on trouve la peroxydase de raifort (horseradish peroxydase : HRP) est la lignine-peroxydase (Lip).la peroxydase de raifort (EC.1.11.1.7) est la plus utilisée pour le traitement des effluents **(Cheng et al. 2006; Cooper et Nicell 1996;Gomez 2006;Qingguo et Walter 2005; Wagner et Nicell; Yu et al.1994)** car elle est active sur une large plage de PH et de températures **(Cheng et al 2006; Karam et Nicell 1997)**et sur les dérivés de type chlorophénols et méthylphénols **(Wagner and Nicell 2001)**.la lignine peroxydase (EC.1.11.1.14)est quant à elle,utilisée pour la dégradation des composés généralement présents dans les effluents issus des industries de fabrication de l'huile et de papier (i.e. le catéchol , le 4-chlorocatechol , le 4.5- dichlorocatechol et le 4- methyl catéchol etc) **(Cohen et al. 2009)**.

L'inconvénient majour lié à l'utilisation des peroxydases est la nécessité d'ajouter du peroxyde d'hydrogène dans le milieu. L'activité de la peroxydase de raifort est en effet controlée par l'addition de H_2O_2**(Cheng et al. 2006; Gomez et al. 2006;Qingguo et Walter 2005)** cela entraine un surcout non négligeable pour le procédé de dépollution.

2.8.2 Les applications de la peroxydase

2.8.2.1 Traitement des composes phénoliques

La peroxydase peut être utilisée pour le traitement des eaux usagées industrielles. Par exemple, les phénols, qui sont les polluants importants, peuvent être retirent par polymérisation enzyme-catalysée utilisant la peroxydase de raifort. Ainsi des phénols sont oxydés aux phénoxy radicaux qui participent aux réactions où sont les polymères et les oligomères produits qui sont moins toxiques que des phénols **(Safa chaouche et Guerromi 2010).**

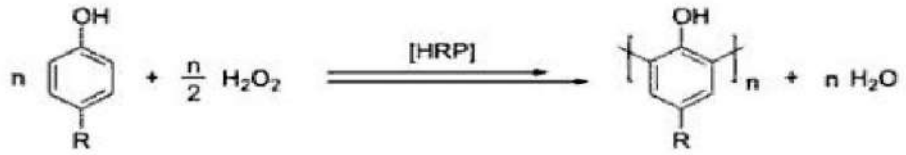


Figure2.11| Polymérisation des phénols catalysés par horseradich peroxydases(HRP), **(Kobayashi et al. 2006).**

2.8.2.2 Production des colorants alimentaires

De plus, la peroxydase surtout celle des plantes est utilisée pour produire des colorants alimentaires basés sur les phénols naturels, pour modifier les colorations des jus, du thé, les parfums industriels…etc**(Safa chaouche et Guerromi 2010).**

2.8.2.3 Propriété antibactérienne de la peroxydase

La lactoperoxydase qui a un effet antibactérien est utilisée dans la conservation du lait cru. Ainsi, ce traitement combiné à un stockage à basse température permet par exemple d'éviter sur une longue période la prolifération de la flore psychotrope, aussi, en plus de la stabilisation du lait et de divers produits alimentaires, d'autres applications du système peroxydase se sont développées tel que, la protection des jeunes animaux comme agent antiinfectueux intestinal, antidiarrhéique; agent de lutte contre les caries dentaires; protecteur des muqueuses en dermatologie**(Safa chaouche et Guerromi 2010).**

2.8.2.4 Utilisation de la peroxydase dans des produits cosmétiques

La peau utilise un ensemble de mécanismes protecteurs pour se défendre contre les attaques de l'environnement. Un des mécanismes protecteurs les plus étudiés est le système de pièges à radicaux libres. Les pièges à radicaux libres aident à protéger la peau en neutralisant les substances dangereuses qui peuvent être produites par l'exposition au soleil et la pollution. La peroxydase qui provient d'un extrait aqueux de fenouil (Foeniculum vulgare) a la capacité de réduire l'érythème provoqué par les UV. La capacité à réduire l'érythème est une mesure

des capacités apaisantes, qui peuvent aussi être considérées comme une capacité à piéger les radicaux libres. Lorsque la peroxydase est présente, elle peut agir pour neutraliser le peroxyde d'hydrogène, apportant ainsi un spectre total de protection contre les radicaux libres**(Safa chaouche et Guerromi 2010)**.

2.8.2.5 Synthèse organique

Les radicaux libres produits par la peroxydase peuvent participer aux différentes réactions de la synthèse de composés organiques. La polymérisation oxydante des composés aromatiques par les oxydoréductases a été étudiée pour créer nouveaux polymèresfonctionnels et synthétiser des résines phénoliques avec une bonne conversion chimiosélectivité. Cela peut être atteint sans l'aide de formaldéhyde toxique qui doit être utilisé dans la polymérisation chimique**(Safa chaouche et Guerromi 2010)**.

2.8.2.6 Biocapteurs à base du peroxydase

Un domaine qui offre un grand potentiel pour les applications de la peroxydase est les biocapteurs électrochimiques. Récemment, les électrodes à base de la peroxydase sont largement utilisées dans les systèmes d'analyse pour la détermination de peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes organiques**(Safa chaouche et Guerromi 2010)**.

2.9 Immobilisation des enzymes

Les problèmes liés à l'inactivation de l'enzyme libre et à sa séparation de produit d'une réaction ont amené les chercheurs à s'orienter vers l'idée de ne plus mélanger l'enzyme libre au substrat mais de faire passer le substrat sur l'enzyme ; ce que permet de conduire les réactions enzymatiques de façon continue et avec possibilité de réutilisation des enzymes.

Immobiliser les enzymes dans une matrice synthétique ne revient certes pas à les mettre dans leur environnement naturel mais représente une bonne approche par rapport à l'étude des enzymes en solution, loin de toute condition physiologique **(KennedyMelo et al.1990)**.

L'immobilisation des enzymes sur des supports synthétiques apporte aussi une stabilité mécanique et une maîtrise plus aisée des paramètres cinétiques (hydrophobicité, matrice chargée imitant la nature polyélectrolyte des membranes naturelles). D'autre part, elle facilite l'étude de la réversibilité vis-à-vis des inhibiteurs puisque l'on peut à tout moment changer de milieu, le support sur lequel l'enzyme est immobilisée **(Carr etBowers 1980;Hartmeier1988)**.

2.9.1Techniques d'immobilisation

Les enzymes peuvent être immobilisées soit par rétention physique, soit par liaison chimique. On peut aussi combiner les deux méthodes pour assurer une meilleure fixation de l'enzyme. La rétention physique exploite la grande différence de taille entre l'enzyme et le substrat, d'où l'idée de créer une barrière semi-perméable pour retenir l'enzyme. Elle peut être un réseau, une capsule ou une membrane **(Zaborsky1974)**. La liaison chimique entre l'enzyme et le support se réalise soit par simple interaction ionique (adsorption), soit par création d'une vraie liaison covalente (fixation covalente sur support activé et coréticulation).

L'immobilisation chimique présente souvent l'avantage de stabiliser la protéine et de permettre une utilisation prolongée **(Weetal 1974)**.Le choix d'une technique d'immobilisation dépend de l'application finale donnée àl'enzyme.

Les principales méthodes d'immobilisation sont :

- **L'adsorption physique :** elle se réalise sur des supports inertes (verres, cellulose, charbon actif). La fixation se fait par interaction des groupes fonctionnels de l'enzyme et du support (liaison hydrogène, forces de Van der Waals, interaction ionique...). Cette adsorption exige des conditions de pH et de force ionique très précises. La moindre variation d'un de ces paramètres provoque une désorption, inconvénient majeur de cette technique.
- **La fixation sur échangeur d'ions:**les enzymes sont porteuses de charges. Elles peuvent donc se lier avec des échangeurs d'ions par liaison électrostatique. Il existe différents types d'échangeurs :
  - des échangeurs cationiques : Carboxyméthyl Cellulose
  - des échangeurs anioniques : Diéthylaminoéthyl Cellulose

Cette fixation est réversible, les conditions opératoires, principalement pH et force ionique, ne doivent pas varier sous peine de désorption.

- **L'inclusion dans un gel :** l'enzyme est emprisonnée à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une matrice. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme et permet la diffusion du substrat.
- **La liaison covalente avec le support :**une liaison est établie entre un groupement fonctionnel de l'enzyme et un groupement fonctionnel du support préalablement activé. Il existe des membranes commercialisées déjà pré activées.
- **La réticulation et la co-réticulation :** le procédé consiste à associer l'enzyme et une protéine de charge à l'aide d'un agent bi ou multifonctionnel. Le complexe formé

possède une masse moléculaire élevée et est insoluble. Le plus souvent, la protéine de charge est l'albumine du sérum bovin (BSA) et l'agent réticulant le glutaraldéhyde ou sa forme polymérisée **(Richards et Knowles 1968)**.

La forme polymérisée résulte d'une condensation aldolique avec perte d'eau. Cet agent bi fonctionnel possède à ses extrémités deux groupements aldéhyde capables de réagir avec les fonctions amine des protéines.

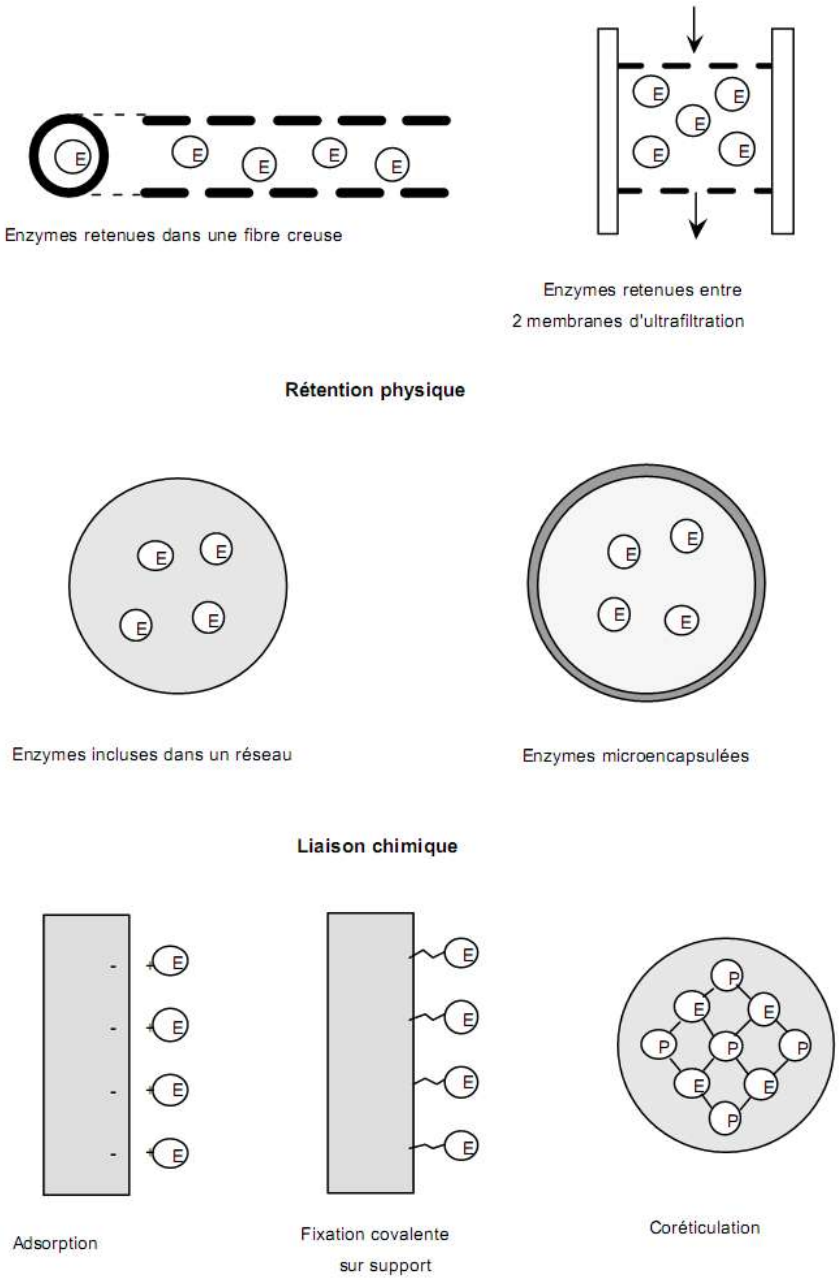


Figure 2.12|Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation des enzymes **(Zaborsky 1974; Richards et Knowles1968; Weetal1974).**

2.9.2 Supports d'immobilisation

2.9.2.1 Classification des supports

Plusieurs critères interviennent dans le choix de support d'immobilisation**(Guisan 2006)**:

– La nature de l'enzyme.

– Le domaine d'application de l'enzyme.

– Le coût du support.

– La compatibilité et la stabilité du support vis-à-vis l'enzyme.

Les supports d'immobilisation peuvent être classés selon leur nature en deux grandes catégories comme le montredans (voir le tableau 2.1.)

Tableau 2.1|Supports d'immobilisation des enzymes **(Guisan 2006).**

Supports organiques	**Supports inorganiques**
polymères naturels • Polysaccharides : cellulose, dextrines, agar, agarose, chitine, alginate. • Protéines : collagène, albumine. • Charbon actif. *Polymères synthétiques* • Polystyrène • Autres polymères : polyacrylate polyméthacrylates, polyacrylamide, polyamides, vinyle, et allyle-polymères	*Minéraux naturels* : silice, bentonite *Matériaux traités* : verre (poreux et non poreux), métaux, Oxydes métalliques

2.9.2.2 Alginate de sodium (support de choix)

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'acidealginique. L'acide alginique est un polymère constitué de résidus d'acides uroniques : acides á-L-guluronique(G) et â-D-mannuronique(M). Puisque c'est le composantsquelettique des algues, il a la propriété d'être fort mais flexible **(Alloue et al. 2008)**.

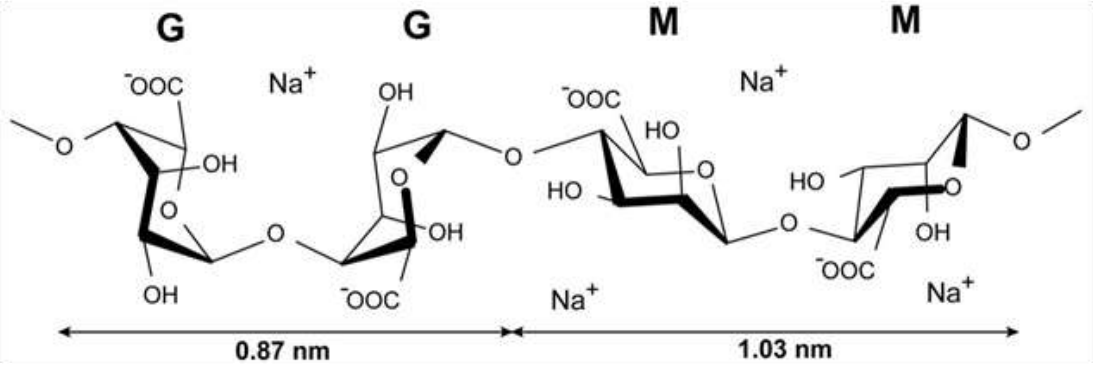


Figure2.13|Structure de l'alginate de Calcium**(Alloue et al. 2008)**.

L'alginate est l'un des polymères le plus fréquemment utilisé pour l'immobilisationpar inclusion non seulement grâce à ses propriétés de gélification mais aussi grâce à sa non-toxicité, sa biodégradabilité, simplicité de mise en œuvre et le coût.

2.9.3 Propriétés des enzymes immobilisées

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

2.9.3.1 Propriétés physico-chimiques

Une des propriétés importantes et caractéristiques de l'immobilisation est l'amélioration de la stabilité dans le temps et de la résistance vis-à-vis de la dénaturation. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend beaucoup du microenvironnement imposé par le support. Ainsi, les enzymes fixées par liaison sulfonamide sont moins stables que celles fixées par liaison azo**(Silvia *Fabiano*)**.

2.9.3.2 Propriétés cinétiques

L'immobilisation des enzymes affecte beaucoup leurs propriétés cinétiques. En effet, à la vitesse de réaction enzymatique proprement dite, il faut ajouter l'effet du microenvironnement qui conditionne toute l'activité catalytique. Ainsi, les phénomènes de diffusion limitent l'accès du substrat au niveau du site enzymatique. Ceci a pour conséquence une variation de la vitesse maximale V_M et de la constante de Michaelis K_M de l'enzyme ; cette dernière constante pouvant avoir une valeur 10 fois supérieure. De même, le pH de l'enzyme peut être modifié, en particulier lorsque la réaction enzymatique met en jeu une libération ou une consommation de protons**(Silvia Fabiano 2002).**

2.10 Conclusion

La tendance actuelle dans le développement de traitement des effluents s'oriente vers les bioprocédé dans les dispositifs de mesure. Jusqu'à maintenant,les procédés enzymatiques ont

été utilisés pour la biodégradation de composés organique comme les phénols et des recherches sont en cours pour élargir les possibilités d'application.

CHAPITRE 3: ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA BIODÉGRADATION DU PHÉNOL PAR LA PEROXYDASE LIBRE ET IMMOBILISÉE

3.1 Introduction

Le présent chapitre est une étude de la biodégradation enzymatique du phénol par la peroxydase du navet blanc sous formes libre et immobilisée dans l'alginate de sodium.

Les effets de certains facteurs sur le bioprocédé tel que le pH, la température, les concentrations de peroxyde d'hydrogène, du phénol et l'activité de l'enzyme ont été évalués afin d'optimiser les conditions d'élimination du phénol.

3.2 Protocoles expérimentaux et méthodes analytiques

3.2.1 Produits chimiques utilisés

Les produits chimiques utilisés durant cette étude (tableau 3.1) sont de qualité analytique. Ils ont été manipulés sans purification préalable. Les solutions ont été préparées avec de l'eau distillée ou avec les solutions tampons. Les principaux produits chimiques utilisés dans cette étude citée dans le tableau 3.1:

Tableau 3.1|Liste des produits chimiques utilisés dans cette étude.

4 aminoantypiryne, $C_{11}H_{13}N_3O$,*99 %*

Acétone, C_3H_6O

Alginate de sodium,$C_6H_7NaO_6$

Chrorure de calcium, $CaCl_2$, 99,5 *%*

Ferricyanure de potassium, $K_3Fe(CN)_6$, *99%*

Peroxyde d'hydrogène,H_2O_2, *30%*

Phénol, C_6H_6,*99 %*

Phosphate monopotassique, KH_2PO_4, *99%*

3.2.2 Préparations des échantillons

Les solutions phénoliques modèles sont préparées en dissolvant le phénol correspondant avec l'eau distillé. Elles avaient des concentrations comprises entre 20 et 140 mg/l. Elles sont conservées à l'obscurité afin de les protéger de la lumière et d'éviter tout vieillissement des constituants de l'échantillon.

3.2.3 Préparation des solutions tampons

Les solutions tampon sont été préparées par dissolution des réactifs appropriés dans l'eau distillée sous agitation magnétique.

Les différentes solutions tampons utilisées sont :

- *Solution tampon pH 2,0 préparée par chlorure de potassium à 0,01M*
- *Solution tampon pH 3,0 ; 4,0 et 5,0 préparée par biphthalate de potassium à 0,01M*
- *Solution tampon pH 6,0 et 7,0 préparée par phosphate monopotassique à 0,01M*
- *Solution tampon pH 8,0 ; 9,0 ; 10,0 préparée par chlorure de potassium à 0,01M et l'acide borique à 0,01M.*

En ajustant le pH des solutions en utilisant les solutions de NaOH (0,2N) et HCl (0,2N),
Le pH des solutions a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre de type « HANNA instrument » équipé d'une électrode de verre combiné. Le pH-mètre a été étalonné avec des solutions tampons standard (pH = 4-7 ou 10).

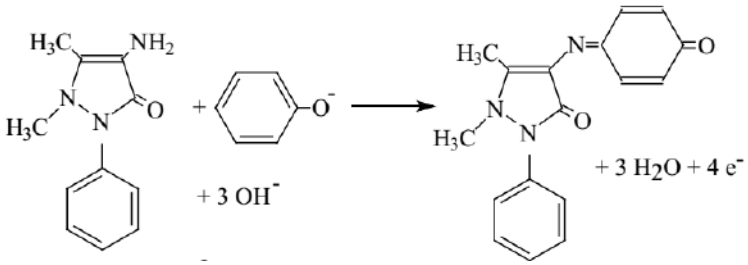
3.2.4 Les méthodes analytiques

3.2.4.1 Méthode de dosage du phénol

Les différents échantillons du phénol prélevés au cours du traitement par peroxydase libre ou immobilisée dans l'alginate de calcium ont été analysés par la méthode colorimétrique qui s'agit de la condensation en milieu basique de l'ion phénate sur la 4-APP en présence d'un oxydant L'hexacyanoferrate(III) de potassium (ferricyanure de potassium), **(Dannis 1951)**. Selon les équations suivantes :



(Eq.3.1)



(Eq.3.2)



(Eq.3.3)

Cette méthode consiste à :

- Déterminer la longueur d'onde maximale de l'absorption du phénol (505 nm)
- Après une durée de déroulement des réactions enzymatiques en présence des différents paramètres qui sont optimisés, les milieux réactionnels sont centrifugés à 3000 rpm pendants 15 min pour éliminer le produit précipité au cours de la réaction et récupérer le surnageant.
- Ajouter 0,3 ml du ferricyanure de potassium (83,4 mM) et 0,3 ml de 4-AAP (20,8mM) sur 2,4 ml du surnageant.
- Diluer ce mélange par la solution tampon pH optimale ($v_{délu}$=25 ml)
- Noter les absorbances de surnageant récupéré pour chaque paramètre a optimisé.
- Les valeurs des Absorbances initiales et finales sont utilisées pour calculer le rendement de biodégradation duphénol selon la relation suivante:

$$\frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100 = R(\%) \quad \text{.....(Eq.3.4)}$$

Avec :

*R :*Rendement de la biodégradation du phénol, *%.*

A_i *:*Absorbance initial de la solution aqueuse, *sans unité.*

A_f *:*Absorbance final de la solution aqueuse, *sans unité.*

La concentration du phénol peut être déterminée parles courbes d'étalonnages à pH 7 et à pH 8, construites à partir d'une série des concentrations du phénol entre 20 et 140 mg/l. Les courbes d'étalonnage ainsi obtenues sont données sur les figure 3.1 et 3.2.

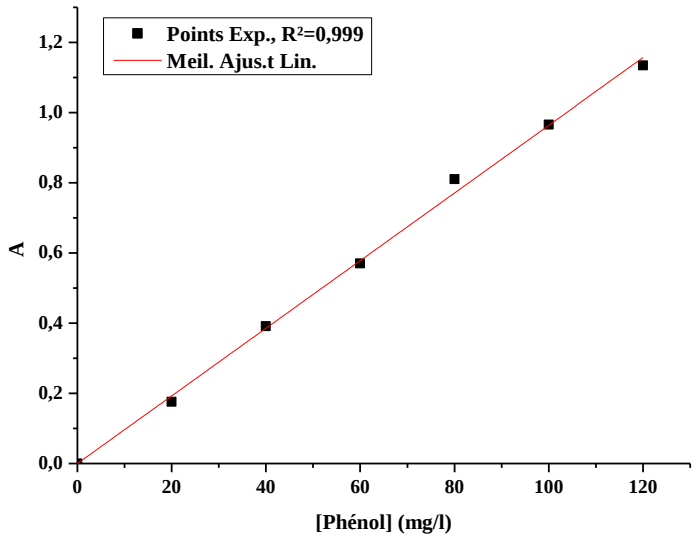


Figure 3.1| Courbes d'étalonnage du phénol, *pH=7, T≈ 25 °C.*

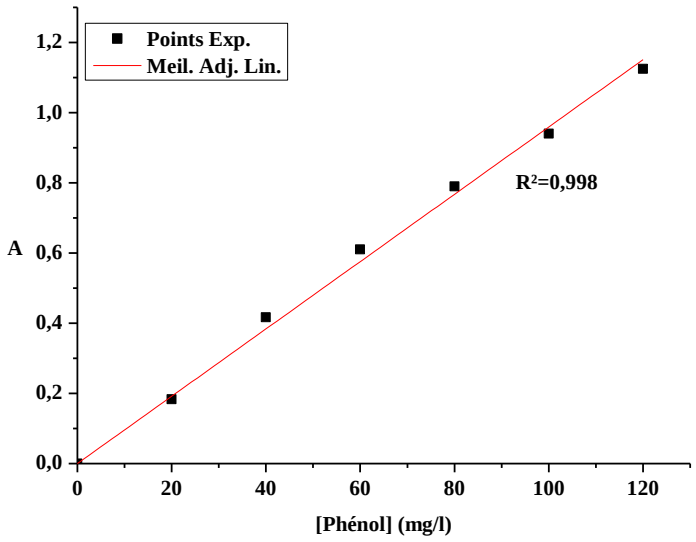


Figure 3.2| Courbes d'étalonnage du phénol, *pH=8, T≈ 25 °C.*

3.2.4.2 Méthode de dosage de l'activité enzymatique (UI/ml) d'enzyme libre

En enregistre en continu la disparition *(transformation)* du sous substrat *(peroxyde d'hydrogène).* Le taux de développement de la couleur au cours de la réaction aura converti à l'activité enzymatique en utilisant un coefficient d'extinction de 7,425 M^{-1} cm $^{-1}$ à base de la biodégradation du peroxyde d'hydrogène par l'enzyme (voir l'annexe). Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui transforme en micromole du peroxyde d'hydrogène par minute à 25 ° C.L'équation 3.1 donne une aperçu générale sur la

réaction effectue entre des deux substrats et la peroxydase en présence de 4-AAP qui joue le rôle d'un chromogène :

$$2\,H_2O_2 + Phénol + 4\text{-}Aminoantipyrine \xrightarrow{\textbf{Peroxydase}} Quinoneimine + 4H_2O \ldots.(Eq.3.5)$$

3.2.4.3 Méthode de dosage des protéines totales (mg/ml)

Cette méthode articule sur la loi de Beer Lamber pour déterminer une concentration inconnue d'une solution protéique Extrait enzymatique partiellement purifié (EEPP). Dans la première étape .on trace la courbe d'étalonnage A= f ([Protéine]) comme suit :

- Prendre 5 tubes à essaies, y introduire :
  - *0,1ml de l'albumine à différentes concentrations [0-100] (mg/l) avec un pas de 25mg/l.*
  - *0,25ml NaOH (1M).*
  - 5ml du réactif de Bradford.
  - Agiter puis laisser les tubes 10 min pour développer la coloration.
  - Chaque concentration correspond à une absorbance.
- A la afin, on trace la courbe A=f ([Albumine]) situe sur la figure 3.4 .

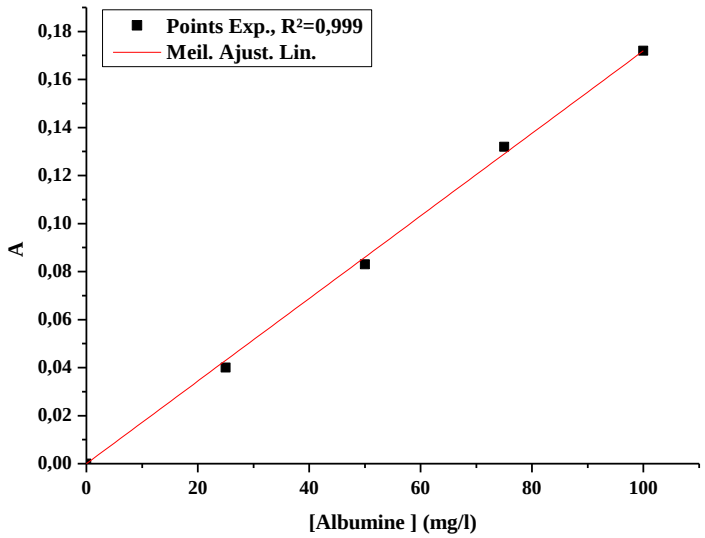


Figure 3.3|Courbe d'étalonnage de l'albumine, λ=590 nm.

- Dans la deuxième étape:
  - On introduire dans un tube a essaie 0,1 ml d'EEPP ensuite ajouter dans le tube :
    - *0,25ml NaOH (1M).*

- *5ml du réactif de Bradford.*

- Agiter puis laisser les tubes 10 min pour développer la coloration.

- Mesurer l'absorbance à 590nm.
- La concentration de la protéine dans l'EEPP est déterminée par la projection de la densité optique de l'EEPP sur la courbe d'étalonnage de l'albumine situé dans la figure précédente (figure 3.3)

3.3 Biodégradation du phénol par la peroxydase libre

Avant tout, Il est primordial de faire l'extraction et la purification de l'enzyme et de déterminé deux paramètres intrinsèques : l'activité enzymatique totale (UI) et la masse de protéine par volume de l'extrait enzymatique (mg/ml).

3.3.1 Méthode d'extraction et purification de peroxydase de navet blanc

La procédure d'extraction et de la purification de la peroxydase de navet est comme suit :

- Mettre 100g de radis dans un mixer après l'avoir éplucher avec 200ml de l'eau distillée. Filtrer avec la gaze, on obtient un extrait brut extrêmement efficace qui peut être dilué avant utilisation.
- Placer un erlenmeyer contenant 200 ml de l'extrait brut et un bécher contenant 200ml de l'acétone au congélateur. Préparer de la glace pilée dans un cristallisoir.
- Après 15mn au congélateur, faire sortir l'extrait brut et le disposer sous l'agitation dans la glace pilée puis verser de l'acétone sortie du congélateur dans l'extrait brut, goutte à goutte.
- Laisser le mélange (l'extrait brut-l'acétone) dans le frigo pendant 2 heures; il se forme un précipité pour le récupérer, centrifuger à 3000 rpm pendant 15min.
- Dissoudre le culot dans 100ml de tampon phosphate (pH6),la solution obtenue est de la peroxydase partiellement purifiée (EEPP).
- Répartir la solution en aliquotes dans des tubes à hémolyse et les placer au congélateur.

L'extrait partiellement purifié (EEPP) de la peroxydase de radis sera utilisé pour la suite de l'étude (voir la figure 3.4).



(a) (b)

Figure 3.4| Extrait enzymatique partiellement purifié(EEPP).

(a) : Conservation d'EEPP dans une solution tampon pH 7, (b) : Culot de centrifugation(EEPP).

3.3.2 Effet des paramètres opératoires sur le rendement et la vitesse de biodégradation du phénol

La méthode d'optimisation du procédé d'élimination du phénol consiste à varier un seul paramètre opératoire dans une expérience. Les paramètres à optimiser sont : le *pH, la* température, les concentrations initiales : du phénol, d' H_2O_2 et l'activité enzymatique ainsi que les temps de contact. Le choix du paramètre optimum basé sur deux paramètres intrinsèques :la vitesse initial (et/ou) le rendement de traitement.

Les intervalles des concentrations ainsi les volumes opérés dans ce travail sont regroupés dans le tableau 3.2 ci-dessous :

Tableau3.2|Valeurs des conditions opératoire à utiliser.

	Paramètres	**Intervalles**	**Volumes (ml)**
Milieu aqueuse	*pH*	2-10	---
	T	[20-80] °C	---
	Solutions tampon	0,50 M	2,8
	Phénol	[20-140]mg/l	1
	H_2O_2	[4-24]mM	1
Enzyme	AE_t	[1-7] UI	0,2

3.3.2.1 Effet du pH du milieu

Le pH est un paramètre essentiel à prendre en compte dans les processus dela biodégradation du phénol par la peroxydase. Ce paramètre agit à la fois sur l'enzyme et sur l'état d'ionisation du phénol.

Procédure

Prendre 9 tubes à essai, et introduire dans chacun :

- 1 ml de H_2O_2
- 1 ml de phénol
- 2,8 ml de solution tampon à différentes pH (2-10).
- A t=0, déclencher la réaction enzymatique par l'injection de 0,2 ml de l'EEPP pour tous les tubes et laisser la réaction se déroule pendant 2 heures.
- Après 2 heures de déroulement des réactions enzymatiques à différents pH, les milieux réactionnels sont centrifugés à 3000 rpm pendants 15 min pour éliminer le produit précipité obtenu lors de la réaction et récupérer le surnageant.
- Prendre 2,4 de surnageant ajouter 0,3 ml de Ferricyanure de potassium et 0,3 ml de 4-AAP.
- Noter les absorbances de surnageant récupéré pour chaque pH.
- Les valeurs des absorbances initiales et finales sont utilisées pour calculer le rendement de décoloration selon l'équation (3.2).

Résultats

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 3.5.

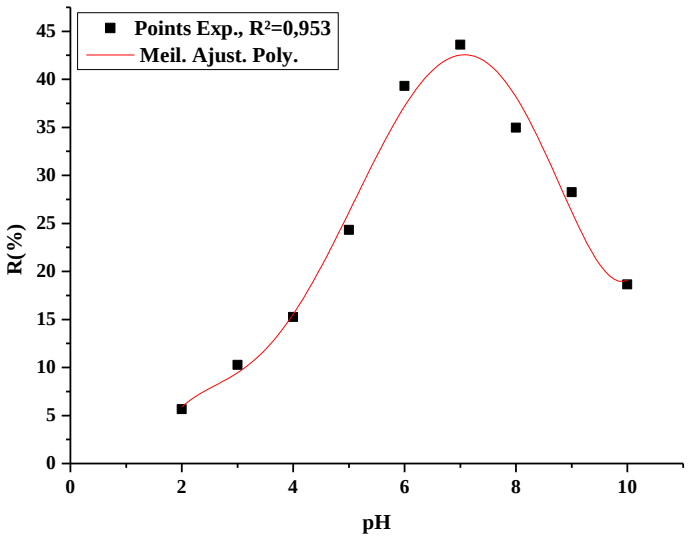


Figure 3.5|Évolution du pH du milieu sur le rendement d'élimination du phénol par la peroxydase libre,*[Phénol]=60 mg/l, [H_2O_2]=2 mM, AE_t=2,33 UI, [Protéine]= 0,38 mg /ml, AS=6,13 UI/mg, temps= 2 heures, T= 23 °C, pH=2-10.*

On constate globalement qu'une augmentation du pH (de pH=2 à pH=7) accélère de manière notable la disparition du phénol qui atteint un taux de 43,6 %.

Dans l'intervalle du pH allé de 8 à 10, le rendement chute et le procédé enzymatique est inhibé. Donc, nous choisissons de travailler avec une phase aqueuse de pH égal à 7.

3.3.2.2 Effet de la température du milieu

Une étude de l'influence de la température sur l'efficacité du procédé enzymatique est réalisée et leurs valeurs varient de 20 jusqu'à 80 °C.

Mode opératoire

- Préparer des tubes à essai contenant :
  - 1 ml de H_2O_2 .
  - 1 ml de phénol.
  - 2.8ml de solution tampon de pH_{opt} =7.
- Régler les étuves aux températures : (20 à 80 °C).
- Pour chaque température incuber deux tubes, l'un des deux est considéré comme témoin.
- Déclencher le chronomètre après l'injection de 0.2 ml d'EEPP.
- Après2 heures, centrifuger les contenus des tubes.

- Prendre 2.4 ml de surnageant, ajouter 0.3 ml de ferricyanure de potassium et 0.3ml de 4-AAP
- Noter les absorbances de surnageant récupéré pour chaque température.

Résultats

Les résultats sont représentés sur la figure 3.6

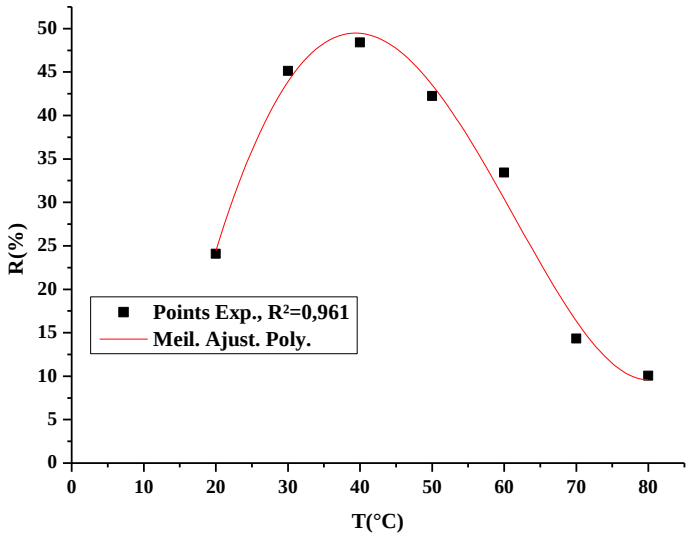


Figure 3.6|Évolution du de la température du milieu sur le rendement d'élimination du phénol par la peroxydase libre,*[Phénol]=60 mg/l, [H_2O_2]=2 mM, AE_t=2,33 UI, [Protéine]= 0,38 mg /ml, AS=6,13 UI/mg, temps= 2 heures, pH=7, T=20-80 °C.*

On constate d'après cette courbe que l'augmentation de T entre (20°C et 40°C) induit une augmentation de la capacité de dégradation de phénol, et on observe une baisse progressive du rendement de la dégradation au-delà de 40°C. Donc on peut dire le rendement de dégradation du phénol est au maximum à T= 40^0C (48,4 %).

3.3.2.3 Effet de la concentration initial du phénol

Dans les effluents industriels, la concentration du phénol est susceptible de varier fortement. Il est donc nécessaire d'étudier son influence sur la vitesse et le rendement de leurs dégradations.

Mode opératoire

Le même protocole est maintenu sous les conditions : pH=7, T_{opt} = 40°C, $[H_2O_2]_0$=2mM, $[EEPP]_0$=2. 33UI/ml, t=15 min, avec les concentrations initiales de phénol de20 jusqu'à 140 $mg.l^{-1}$avec un pas de 20mg/l.

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 3.7 et 3.8

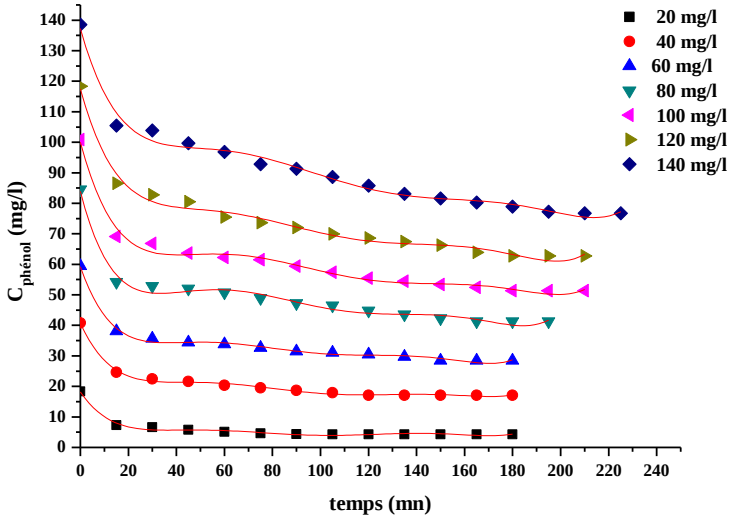


Figure 3.7|Évolution temporelle de la vitesse de la biodégradation du phénol présent dans le surnageant du milieu réactionnel, *[Phénol]=60 mg/l, $[H_2O_2]$=2 mM, AEt=2,33 UI, [Protéine]= 0,38 mg /ml, AS=6,13 UI/mg, temps= 220 minute, pH=7, T= 40 °C.*

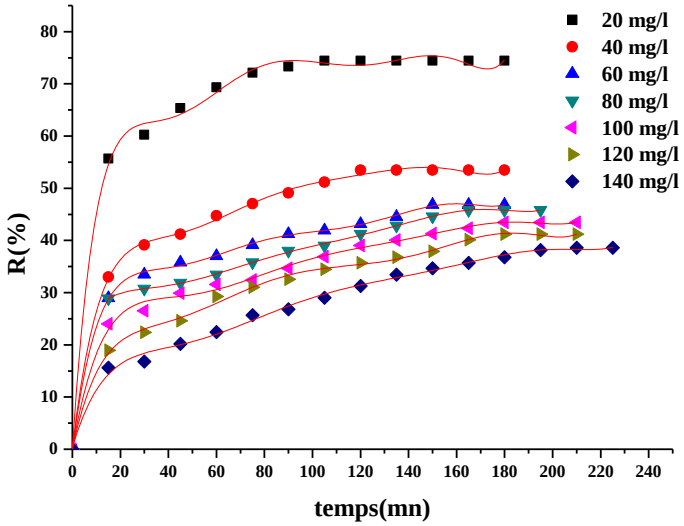


Figure 3.8| Évolution temporelle du rendement de la biodégradation du phénol présent dans le surnageant du milieu réactionnel, *[Phénol]=60 mg/l, $[H_2O_2]$=2 mM, AE_t=2,33 UI, [Protéine]= 0,38 mg /ml, AS=6,1 3 UI/mg, pH=7, T= 40 °C.*

Les figures (3.7et 3.8) indiquent l'évolution temporelle de la concentration du phénol présent et leurs rendements d'éliminations respectivement dans le surnageant du milieu réactionnel. La concentration optimale à dégrader par ce procédé enzymatique a été effectué par le suivre de l'évolution des vitesses initiales de la réaction et les rendements correspondants en fonction des concentrations du phénol.

Pour chaque cinétique, on trace une tangente, à partir de $t = 0$, correspondant à la plus grande portion *"linéaire"* (cette estimation visuelle dépend de l'expérimentateur). La pente de la tangente à l'origine de la cinétique *(d[phénol] /dt)* s'appelle la vitesse initiale de la réaction enzymatique, V_0.

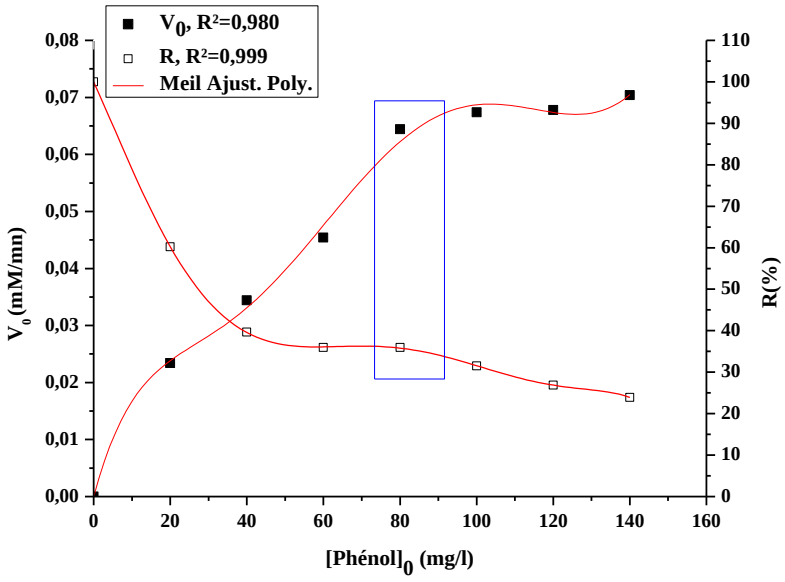


Figure 3.9|Effet de la concentration initial du phénol sur la vitesse initial et le rendement de biodégradation du phénol, *[H_2O_2]=2 mM, AE_t=2,33 UI, [Protéine]= 0,38 mg /ml, AS=6,13 UI/mg, temps= 2 heures, pH=7, T= 40 °C,[phénol]=0-140 mg/l.*

D'après les résultats consignés dans la figure 3.9, nous remarquons que l'évolution de la vitesse initiale est inversement proportionnelle avec l'évolution de rendement. Tel que les deux courbe V_0*= f([phénol]) et R= f([phénol])*sont coïncide dans le point de cordonnées *(V_0, R, $[phénol]_0$)=(0,03.45.35)*. A partir de ce point, La vitesse initial croie et le rendement correspondant décroit jusqu'à le point de coordonnée *(V_0,R, $[phénol]_0$)=(0,064.36.80)* .Ce point présent la condition optimal pour avoir une vitesse et un rendement maximal.

Cette concentration en phénol *(80 mg/l)* sera fixée comme valeur optimal pour le reste de travail.

3.3.2.4 Représentation de Lineweaver-Burk

Pour améliorer la précision de la détermination graphique des constantes de la cinétique enzymatique, il existe des représentations graphiques qui linéarisant les résultats .Permettant des extrapolations plus précises. La méthode la plus connue est celle de Lineweaver et Burck dans laquelle on représente $(1/V_0)$en fonction de$1/[phénol]$(voir la figure 3.10).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}[phénol]_0} + \frac{[phénol]_0}{V_{max}[phénol]_0} \quad \text{.....(Eq.3.6)}$$

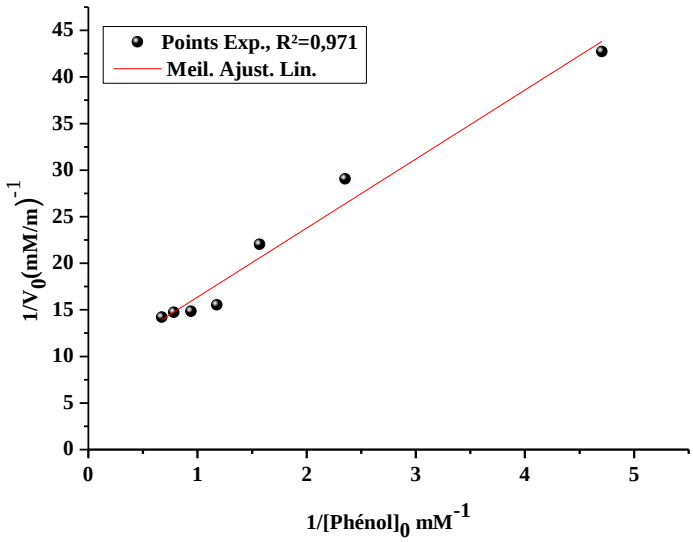


Figure 3.10| Représentation graphique Lineweaver-Burk,

Cette représentation permet donc à partir des mêmes données que précédemment de déterminer graphiquement les valeurs de K_M*(0,826 mol/l)* et de V_{max} *(0,112 mM/mn)*qui corresponds à l'ordonnée à l'origine et au rapport(K_M*/pente de la droite)* respectivement .

D'où : l'équation 3.6devient :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{0{,}826}{0{,}112[phénol]_0} + \frac{[phénol]_0}{0{,}112[phénol]_0} \quad \text{.....(Eq.3.7)}$$

3.3.2.5 Effet de la concentration initial de H_2O_2

Après la détermination de concentration de phénol optimale, on s'oriente vers l'effet de peroxyde d'hydrogène pour préciser la concentration pour laquelle en aura une autre amélioration de rendement de dégradation de phénol.

Mode opératoire

L'effet de concentration de peroxyde d'hydrogène sur la performance de bioprocédé de dégradation du phénol a été suivi sous les conditions opératoires suivantes : [Phénol]=80 mg/l, pH=7, T=40 °C, AE_t =2,33 UI, temps= 2 heures avec les concentrations initiales de peroxyde d'hydrogène entre (4-25 mM).

Résultats

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 3.11.

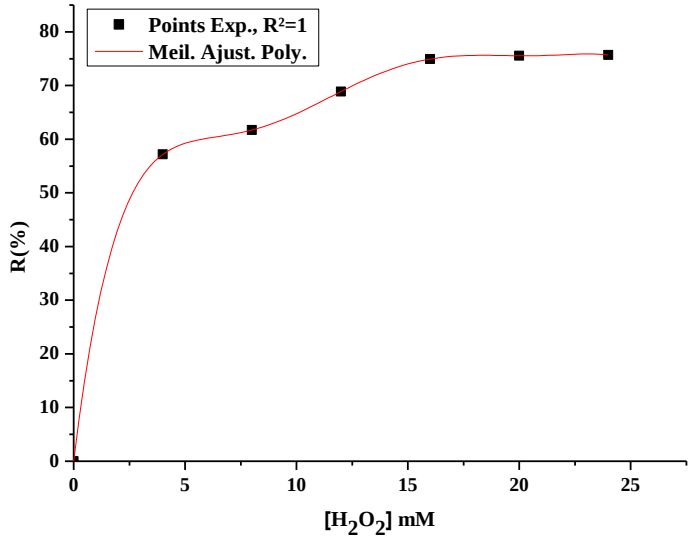


Figure 3.11|Influence de la concentration de peroxyde d'hydrogène sur le rendement de biodégradation du phénol par la peroxydase libre,*[Phénol]=80 mg/l, pH=7, T=40 °C, AE_t=2,33 UI, temps= 2 heures, T= 40 °C, $[H_2O_2]$=4-24mM.*

D'après les résultats indiqués sur la figure 3.11, nous remarquons que le rendement de biodégradation du phénol s'améliore avec l'augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène jusqu'à 76 % pour une concentration de 24 mM qui correspond à la concentration optimal. Le rapport $[H_2O_2]_0$/[phénol]$_0$ a été de l'ordre de 28.

3.3.2.6 Effet de l'activité enzymatique totale

Mode opératoire

Pour étudier l'influence de ce paramètre sur l'élimination de phénol, nous avons maintenu constants les paramètres suivants: les concentrations de phénol et peroxyde d'hydrogène de 80 mg/l et 24 mM respectivement, temps de contact = 2 heures, la température du milieu= 40 °C, pH=7. Et nous suivons le même protocole précédent.

Résultats

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 3.13.

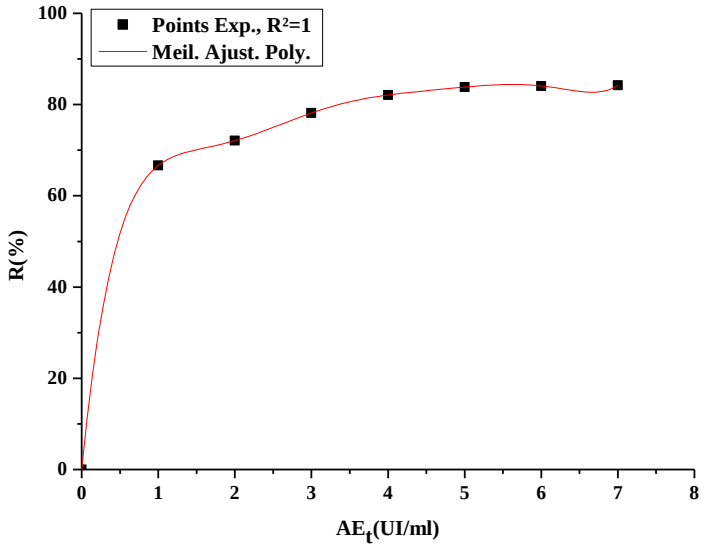


Figure 3.12| Influence de l'activité enzymatique totale sur l'élimination du phénol par la peroxydase libre,*[Phénol]=80 mg/l, [H_2O_2]=24 mM, temps= 2 heures, T= 40 °C, pH=7, AE_t=0-7 UI.*

D'après les résultats consignés sur la figure 3.12, nous remarquons une augmentation du rendement en fonction de l'augmentation de l'activité enzymatique totale. Ce résultat est évident puisque la disponibilité des sites enzymatiques induit l'attraction avec les molécules de substrat et par la suite le nombre de molécules converties par unité de temps sera élevé. Le meilleur taux d'abattement *(84 %)* est obtenu pour une activité enzymatique totale égale à *7 UI.*

3.3.2.7 Effet du temps de contact

Mode opératoire

Les conditions fixées pour l'étude de ce paramètre sont: la concentration du phénol= 80 mg/l, volume d'EEPP= 0, 2 ml, concentration de peroxyde d'hydrogène = 40 mM, sous pH=7 et une température du milieu de 40 °C. Les résultats obtenus sont représentés dans (la figure 3.13)**.**

Résultats

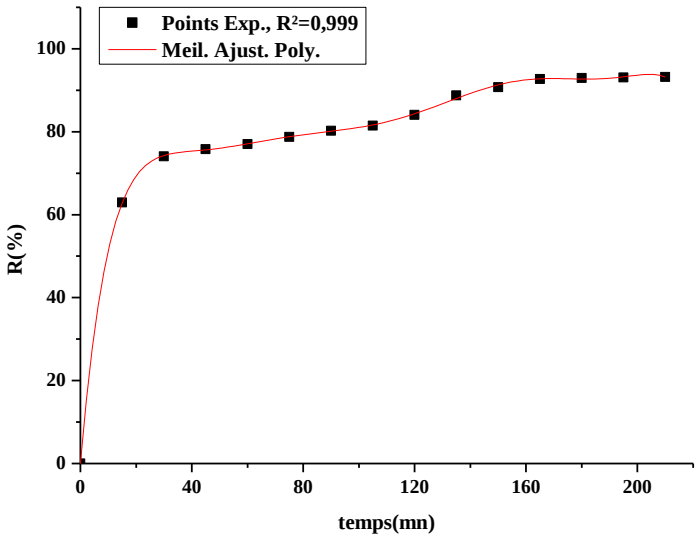


Figure 3.13| Cinétique de biodégradation du phénol sous les conditions optimales,*[Phénol]=80 mg/l, [H_2O_2]=24 mM, pH=7, T= 40 °C, pH=7, AE_t=7 UI , temps=2heurs.*

D'après la figure 3.13, le rendement de la biodégradation du phénol par la peroxydase libre augmente avec le temps de contact jusqu'à l'obtention d'un palier. Le maximum du rendement de biodégradation est obtenu pour un temps de contact de *180 minutes*. Au-delà de cette durée, le rendement demeure constant *(93 %)*.

3.4 Biodégradation du phénol par la peroxydase encapsulé par l'alginate de sodium

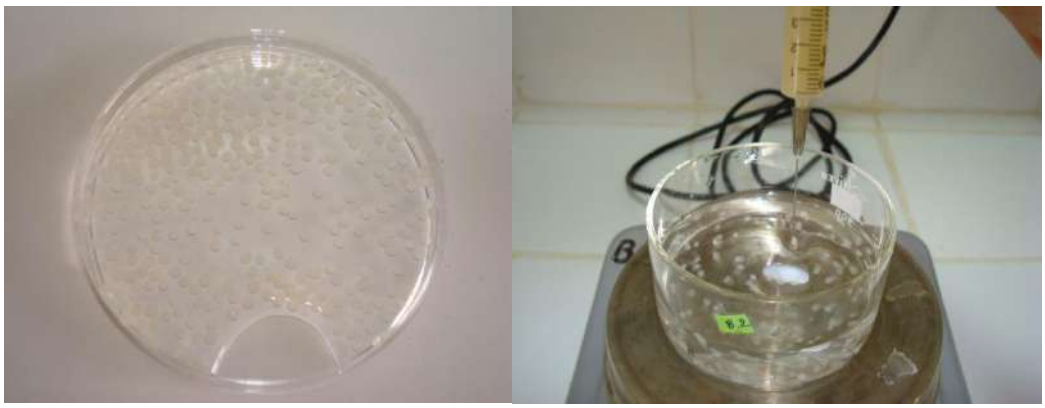
L'objectif de cette partie est d'étudier la biodégradation du phénol par la peroxydase immobilisée dans l'alginate de calcium et de déterminer l'influence des paramètres opératoires sur le rendement et la vitesse de dégradation en comparaison avec les résultats obtenus avec l'enzyme libre.

3.4.1 Support d'encapsulation

L'alginate est l'un des polymères le plus fréquemment utilisé pour l'immobilisation par inclusion non seulement grâce à ses propriétés de gélification mais aussi grâce à sa non-toxicité, sa biodégradabilité, simplicité de mise en œuvre et le coût. La gélification qui est l'une des principales propriétés des alginates est due au fait qu'ils réagissent avec les cations divalents (sauf le magnésium) et précipitent lorsque ces cations sont en excès. La structure ionique du gel est thermostable dans la gamme de 0 – 100°C; donc le chauffage ne liquéfiera pas le gel**(Bernd et Rehm 2009 et Alloue et al. 2008)**.

3.4.2 Méthode d'encapsulation d'enzyme

- Dans un bécher, dissoudre 0,15 g d'alginate de sodium dans 10 ml de la peroxydase partialement purifié sous forme libre.
- Laisser le mélange peroxydase /alginate de sodium sous l'agitation pendant (1-1,5 heures) jusqu'à l'obtention d'un mélange visqueux homogène.
- Laisser le mélange repose 20 min pour éviter les bulles d'air qui peuvent causer la flottation des billes à la surface de la solution de $CaCl_2$ (Garder la solution de $CaCl_2$ dans le réfrigérateur avant faire l'encapsulation de l'EEPP par l'alginate de sodium).
- Préparer les billes de la peroxydase immobilisée, en faisant verser le mélange obtenu goutte à goutte à l'aide d'une seringue, dans un 50 ml de solution de $CaCl_2$ de concentration de 0,05 M sous l'agitation.
- Laisser les billes sous l'agitation dans la solution de $CaCl_2$ pendant 1 heure.
- Rincer les billes avec l'eau distillée et les conserver dans une solution tampon de pH 6 dans un réfrigérateur sous une température de 4°C **(Laidani et Tanjaoui 2010)**, (voir la figure 3.14)



(a) (b)

Figure 3.14| Peroxydase immobilisée dans les billes d'alginate de calcium

(a) Photo de quelques capsules, **(b)** Dispositif expérimental de préparation d'encapsulation.

Les intervalles des concentrations ainsi les volumes opérés dans cette partie sont regroupés dans le tableau 3.3 ci-dessous :

Tableau 3.3|Valeurs des conditions opératoires.

	Paramètres	Intervalle	Volumes (ml)
Milieu	*pH*	2-10	---
aqueuse	*T*	[20-90] mM	---
	Solutions tampon	0,50 M	2,8
	Phénol	[20-140] mg/l	1
	H_2O_2	[1-15,4] mM	1
Enzyme	AE_t	[1-5] UI	0,2
	Nbre des billes	[25-50] billes	---

3.4.3 Caractéristiques physico-chimiques de billes encapsulées

Les caractéristiques physicochimiques d'une bille de peroxydase sont indiquées comme suit :

Masse = 0,028 g

Diamètre=2,251 mm

Volume= 5,960 mm^3

Masse volumique = 1,74 g/ml

3.4.4 Méthode de dosage de l'activité enzymatique des billes encapsulées

L'activité enzymatique en (UI) de l'enzyme piégé dans l'alginate de calcium a été calculée par la relation suivante:

$$AE_i = \frac{AE_l \times V_l - (AE_r \times V_r + AE_{CaCl2} \times V_{CaCl2} + AE_{sc} \times V_{sc})}{N} \quad \text{.....(Eq.3.7)}$$

Où :

AE_i : Activité enzymatique de l'enzyme immobilisée, *UI/ml*.

AE_l et V_l: Activité enzymatique *(UI/ml)* et volume de l'enzyme libre *(ml)* respectivement.

AE_{sc} et V_{sc} : Activité enzymatique *(UI/ml)* et volume de la solution de conservation *(ml)* respectivement.

AE_{Cacl2} et V_{Cacl2} : Activité enzymatique *(UI/ml)* et volume de la solution de Chlorure de calcium *(ml)* respectivement.

AE_r et V_r : Activité enzymatique (UI/ml) et le volume de solution de rinçage

N : Nombre de billes totales.

3.4.5 Essais de la biodégradation du phénol par la peroxydase immobilisée

- La méthode consiste à introduire dans un tube à essaie :
  - 1 ml de solution phénolique,
  - 1 ml de peroxyde d'hydrogène,
  - 2.8 ml de solution tampon,
  - 25 billes de la peroxydase immobilisée,
- Placer le mélange réactionnel dans une étuve a température adopté.
- Lancer la cinétique, par la mesure de densité optique avec un pas de 10 minutes.
- Le rendement de biodégradation du phénol est déterminé par la méthode précédente.

3.4.5 Suivi des paramètres opératoires en fonction du rendement et la vitesse de biodégradation du phénol

3.4.5.1 Suivi du pH

Procédure

La procédure est identique à celle conduite avec l'enzyme libre. La composition des Mélanges réactionnels se prend sous les conditions(T=23°C, [Phénol]=60 mg/l, $[H_2O_2]_0$=2 mM) et introduire 25 billes de peroxydase immobilisée.

Résultats

Les résultats obtenus sont présenté sur la figure ci-dessous :

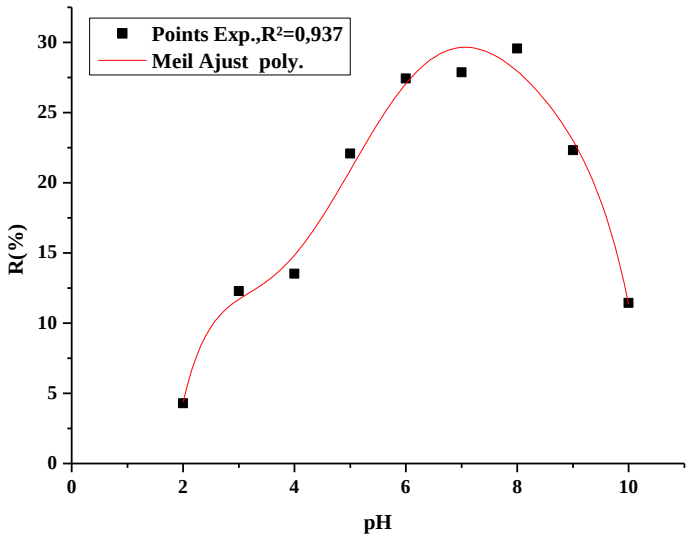


Figure 3.15| Influence du pH de milieu sur le taux d'abattement du phénol, *[Phénol]=60 mg/l, [H_2O_2]=2 mM, T= 23°C, AE_t=2,3 UI, Nombre des billes=25, pH=2-10.*

D'après la figure 3.15, nous constatons que le meilleur rendement de biodégradation est obtenu à pH basique *(pH 8)* avec un taux d'abattement de l'ordre de *29,5 %*. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par **(Alemzadeh et Nejati 2009)**.

3.4.5.2 Suivi de la température de milieu

Nous avons suivi l'impact de température du milieu sur la performance de la peroxydase immobilisée.

Procédure

Sous des conditions de pH =8, $[phénol]_0$=60 mg/L, $[H_2O_2]_0$=2 mM ,25 billes, $[H_2O_2]$/[phénol] ≈3, AE_t=2,3 UI. Fait varier la température des mélanges réactionnels dans un domaine compris entre (20 et 80) °C afin d'étudier l'influence de la température des mélanges sur l'activité de la peroxydase immobilisée.

Résultats

Les résultats du suivi spectrophotométrie sont regroupés dans la figure 3.16.

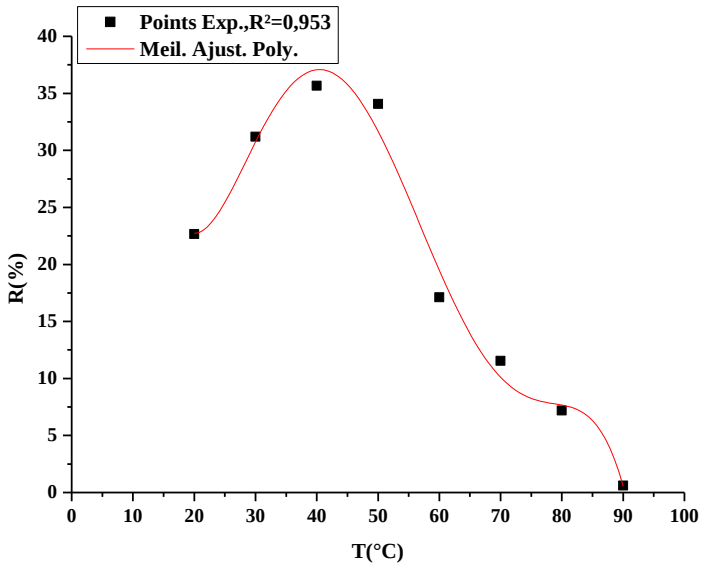


Figure 3.16| Influence du température de milieu sur le taux d'abattement du phénol, *[Phénol]=60 mg/l, [H_2O_2]=2 mM, pH=8, T= 40 °C, AE_t=2,3 UI, Nombre des billes=25 billes, T=20-90 °C.*

Le rendement de biodégradation du phénol évolué en fonction de la température avec une allure polynomial de l'ordre 7. Le rendement maximum atteint le 35,5 % avec une température de 40 °C.

3.4.5.3 Suivi de la concentration du phénol

Procédure

Pour étudier l'influence de ce paramètre sur la vitesse initial et le rendement de biodégradation du phénol, nous avons maintenu constants les paramètres suivants : la concentration du peroxyde d'hydrogène= 2 mM, l'activité enzymatique totale = 2,3 UI/ml, le pH= 8, la température = 40 °C et nombre des billes encapsulés= 25 billes.

Résultats

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 3.17 et 3.18.

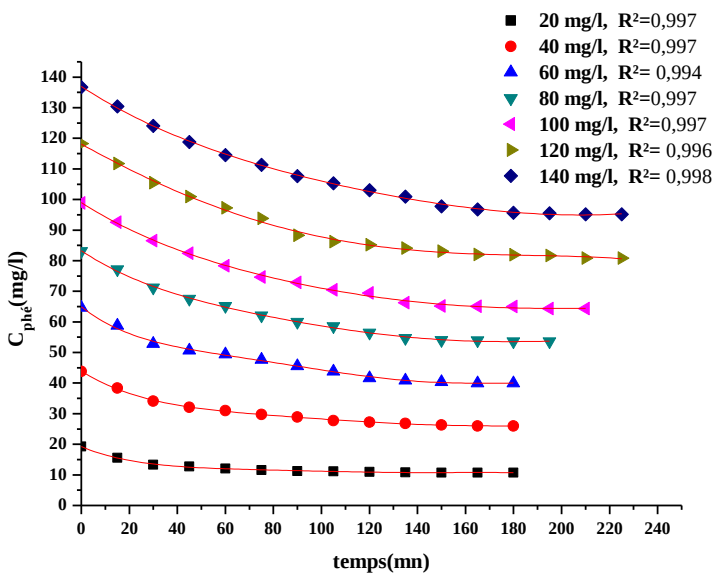


Figure 3.17|Évolution temporelle de la vitesse de biodégradation du phénol présent dans le surnageant du milieu réactionnel, *[Phénol]=60 mg/l, [H_2O_2]=2 mM, AE_t=2,30 UI, pH=8, T= 40 °C, Nombre des billes=25 billes.*

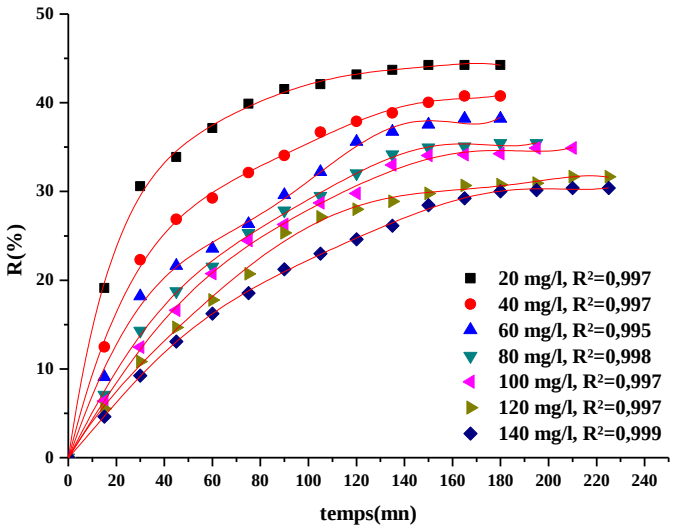


Figure 3.18| Évolution temporelle du rendement de biodégradation du phénol présent dans le surnageant du milieu réactionnel, *[Phénol]=60 mg/l, [H_2O_2]=2 mM, AE_t=2,30 Ul, pH=7, T= 40 °C, Nombre des billes=25 billes.*

Dans le but de déterminer la concentration du phénol optimal à éliminer par la peroxydase encapsulée, nous avons suivi la même méthode précédente (voir la figure 3.19).

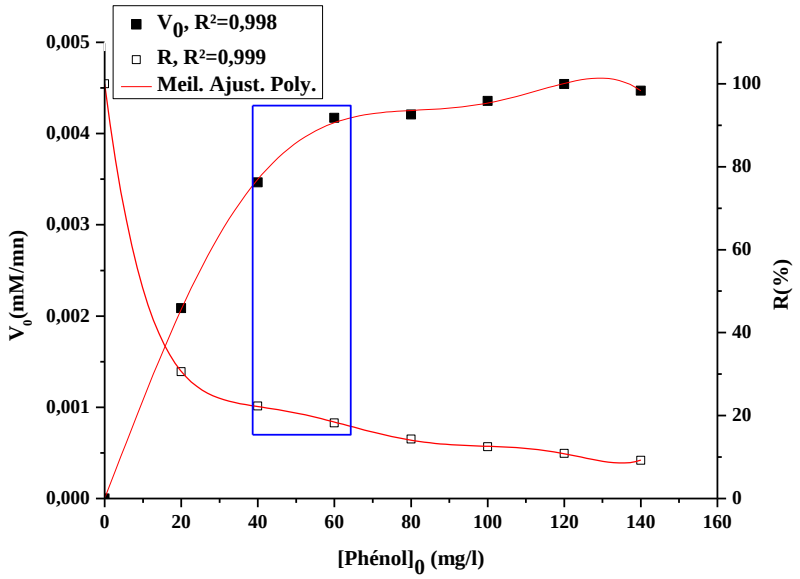


Figure 3.19| Effet de la concentration initial du phénol sur la vitesse initial et le rendement de biodégradation du phénol, *[Phénol]=60 mg/l, [H_2O_2]=2 mM, AE_t=2,30 UI, pH=7, T= 40 °C, Nombre des billes=25 billes.*

D'après les résultats consignés sur la figure 3.19, nous remarquons que l'évolution de la vitesse initiale est inversement proportionnelle avec l'évolution du rendement. Tel que les deux courbe *V_0= f([phénol]) et R= f([phénol])* sont coïncide dans le point de cordonnées *(V_0, R, [phénol]$_0$)=(0,0038.21,27.**46**)*. Ce point peut être considéré comme un point optimal.

3.4.5.4 Représentation de Lineweaver-Burk

L'application des modèles de Lineweaver-Burk à la biodégradation du phénol par la peroxydase immobilisée a donné les résultats illustrés dans (la figure 3.20).

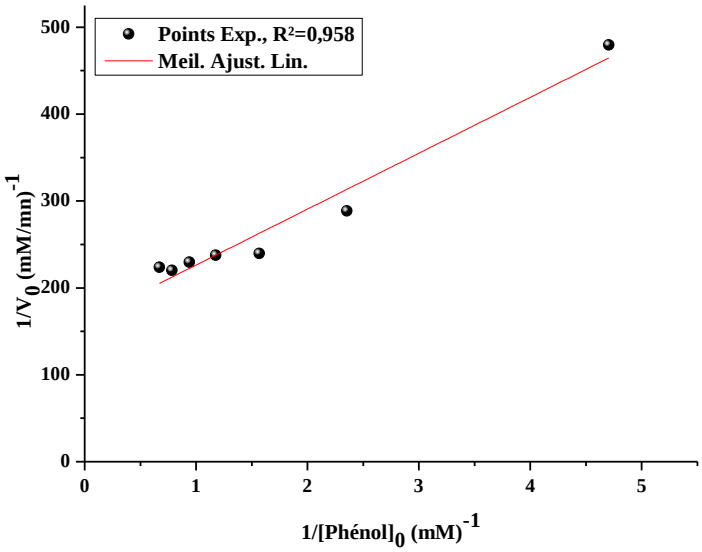


Figure 3.20| Représentation graphique Lineweaver-Burk.

Grâce à un ajustement par l'origine, nous avons obtenu pour la loi étudiée des droites avec un coefficient de corrélation satisfaisant (R^2=0,958). Les constantes de Lineweaver-Burk sont déterminés à partir de la linéarisation de l'équation 3.5 comme il indique la figure 3.20:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}[phénol]_0} + \frac{[phénol]_0}{V_{max}[phénol]_0} \quad \text{.....(Eq.3.8)}$$

L'équation 3.8 devient :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{0{,}397}{0{,}0062[phénol]_0} + \frac{[phénol]_0}{0{,}0062[phénol]_0} \quad \text{.....(Eq.3.9)}$$

Avec : V_{max}= 0,0062 mM/mn et K_M=0,397 mM.

3.4.5.5 Suivi de la concentration du peroxyde d'hydrogène

Procédure

Dans cette étude, nous fixons à chaque fois les conditions opératoires et en faisant varier la concentration en peroxyde d'hydrogène. Les valeurs du peroxyde d'hydrogène considérées sont à l'intervalle [1-14,2] mM à température de 40°C avec une concentration en phénol de 46 mg/l et activité enzymatique égale à 2,3 UI/ml pendant une durée de 2 heures.

Résultats

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 3.21.

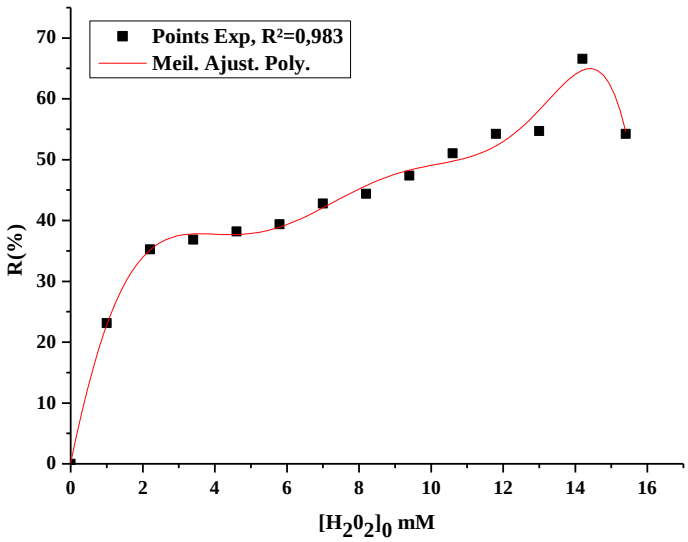


Figure 3.21| Influence de concentration du peroxyde d'hydrogène sur le taux d'abattement du phénol, *[Phénol]=46 mg/l, pH=8, T= 40 °C, AE_t=2,3 UI, Nombre des billes=25 billes,[H_2O_2]=1-15,4 mM.*

D'après les résultats illustrés dans la figure 3.21, nous constatons que le rendement de biodégradation augmente brusquement avec la concentration en peroxyde d'hydrogène jusqu'à l'obtention d'une chute. Le meilleur taux d'abattement est obtenu pour une concentration en peroxyde d'hydrogène de *13 mM* soit *55 %* avec un fraction de concentration $[H_2O_2]_0/[phénol]_0$= *27* fois.

Le chute du rendement du procédé a été observé en parallèle avec une flotation des billes de la peroxydase a la surface de la solution pour des concentrations élevés de ($[H_2O_2]$> 13 mM) par contre pour des concentrations faibles les billes se déposent au bas de tube. Ceci peut être expliqué par le fait que les billes soient remplis par les bulles de gaz qui les portent à la surface sachant que H_2O_2à une propriété de dégager d'une manier intense l'oxygène est surtout s'il est en forte concentration donc cette propriété peut gêner et limiter l'action de la peroxydase **(Ahmadi 2010).**

3.4.5.6 Effet de l'activité enzymatique totale

Procédure

Pour étudier l'influence de ce paramètre sur l'élimination de phénol, nous avons maintenu constants les paramètres suivants: les concentrations de phénol et peroxyde d'hydrogène de 46 mg/l et 13 mM respectivement, temps de contact = 2 heures, la température du milieu= 40 °C, et pH=8. Et on fait varier l'activité enzymatique des billes de [1-5] UI.

Résultats

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.22.

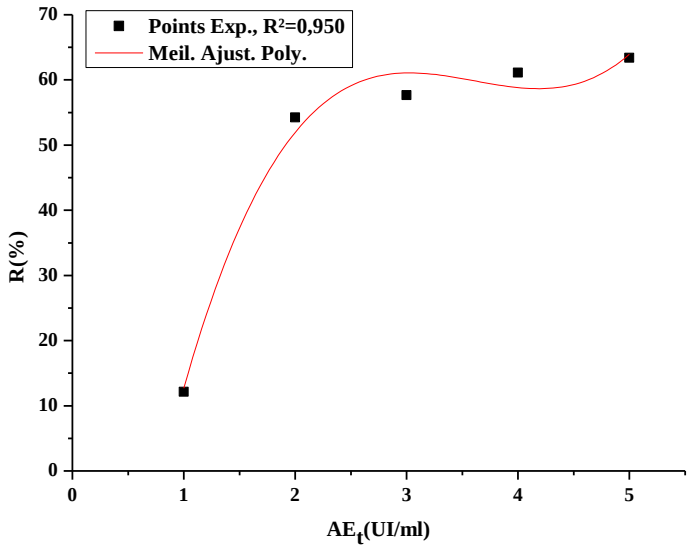


Figure 3.22| Influence de l'activité enzymatique total sur le taux d'abattement du phénol, *[Phénol]=46 mg/l, $[H_2O_2]$=13 mM, pH=8, T= 40 °C, Nombre des billes=25 billes, AE_t=1-5 UI.*

D'après les résultats consignés dans la figure 3.22, nous remarquons que le rendement de biodégradation du phénol augmente de manière significative pour une faible activité enzymatique jusqu'à atteindre une valeur de *63,4 %* pour une AE_t*= 4 UI*. Au-delà de cette valeur, cette augmentation devient très faible, *(*ΔR *= 2,20 %*).

Le meilleur taux d'abattement est obtenu pour une activité enzymatique de *5 UI* soit *63,4 %*. L'activité enzymatique optimale est de *5 UI*.

3.4.5.7 Suivi de nombre des billes de la peroxydase encapsulée

Afin d'améliorer le rendement, nous avons suivi l'effet du nombre des billes de la peroxydase encapsulée.

Procédure

La même procédure est utilisée et sous les même conditions mais avec une activité enzymatique égale à 5 UI et on fait varier le nombre de billes de (25-50) billes avec un pas de 5 billes.

Résultats

Les résultats sont présentés dans la figure suivante :

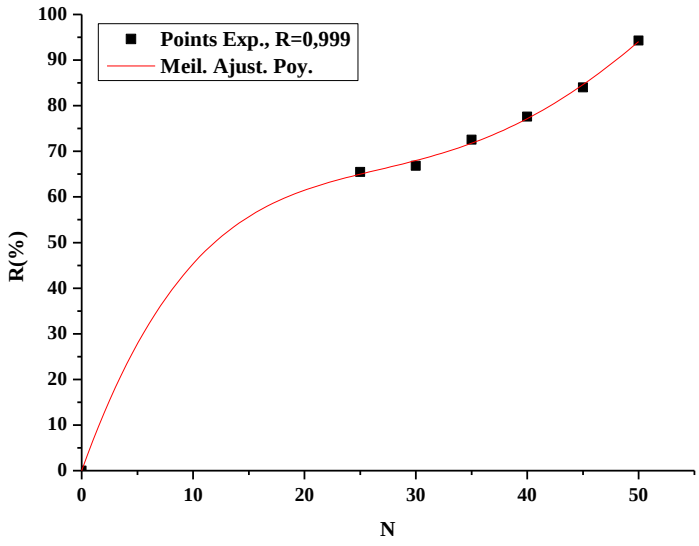


Figure 3.23|Influence de nombre de billes (N) sur le taux d'abattement du phénol(R), *[Phénol]=46 mg/l, [*H_2O_2*]=13 mM, pH=8, T= 40 °C, Nombre des billes=25-50 billes.*

L'allure de *R=f(Nombre des billes)*montre que l'augmentation du nombre des billes conduit à l'augmentation du taux d'abattement du phénol qui atteint *93,3 %* avec *50* billes. Ce nombre des billes en peroxydase *(50 billes)* auront fixé comme valeur optimal pour le reste du travail.

3.4.5.8 Suivi du temps de contact

Les conditions optimales déterminées précédemment, ont été appliquées pour l'oxydation du phénol.

Résultats

La figure 3.24 montre l'évolution de la concentration du phénol en fonction du temps de traitement par la peroxydase immobilisée. Il en ressort que la disparition du phénol est partiellement lente que nous n'avons suivre facilement leurs cinétiques de disparition. L'efficacité élevée de ce procédé est due à l'introduction de H_2O_2 et les billes de peroxydase dès le début du traitement sous une température égale à*40 °C* et *pH=8*. Le rapport des concentrations $[H_2O_2]_0/[phénol]_0 = 27$.

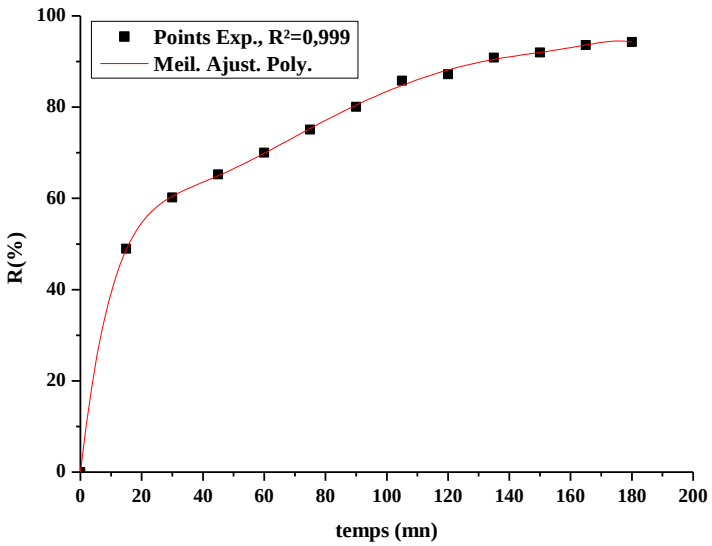


Figure 3.24|Cinétiques de disparition du phénol par la peroxydase encapsulées, *[Phénol]=46 mg/l, $[H_2O_2]$=13 mM, pH=8, T= 40 °C, Nombre des billes=50, AE_t= 5 UI,$[H_2O_2]_0/[phénol]_0$=27.*

Le taux d'abattement du phénol atteint *93, 6 %* au bout de *165* minutes de traitement. Ceci montre que l'oxydation est presque totale.

3.4.5.9 Réutilisation de l'enzyme encapsulé

Procédure

Le test de reproductibilité de l'enzyme encapsulé a été réalisé en appliquant La même procédure précédente sous les conditions optimales et après 165 min les milieux sont centrifugés mais cette fois les billes aussi sont récupéré et laver avec de l'eau distillé puis on les conserver dans une solution tampon pH=6 pour lés utilisés plusieurs fois.

Résultats

Les résultats sont présentés sur la figure 3.25.

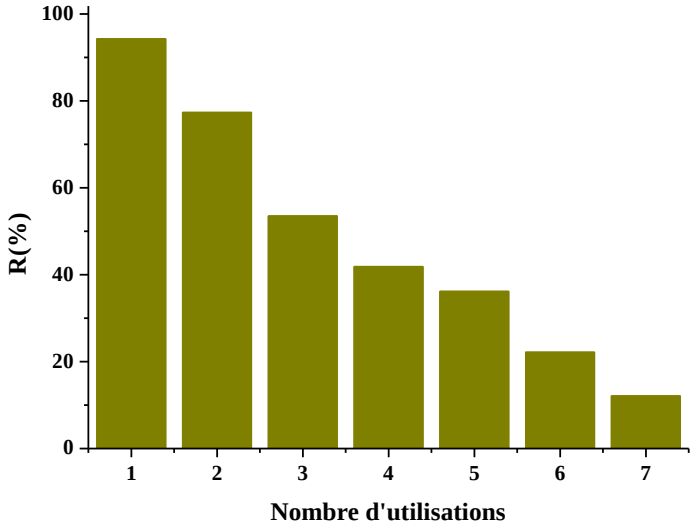


Figure 3.25| Réutilisation de l'enzyme encapsulé, *[Phénol]=46 mg/l, [H_2O_2]=13 mM, pH=8, T= 40 °C, Nombre des billes=50, AE_t= 5 UI,[H_2O_2]$_0$/[phénol]$_0$=27, temps du contact=165 mn.*

Le rendement diminue brusquement dès la troisième réutilisation, où il passe de 94,3%à 53,5 %et atteint 12,2 %après la septième réutilisation .Cela est dû à l'accumulation de la matière polymérisée par la réaction enzymatique à l'intérieur des billes, qui se gonflent et changent leurs couleurs (voir la figure 3.26).Ce phénomène gène la diffusion du produit vers l'extérieur et du phénol vers l'intérieur des billes

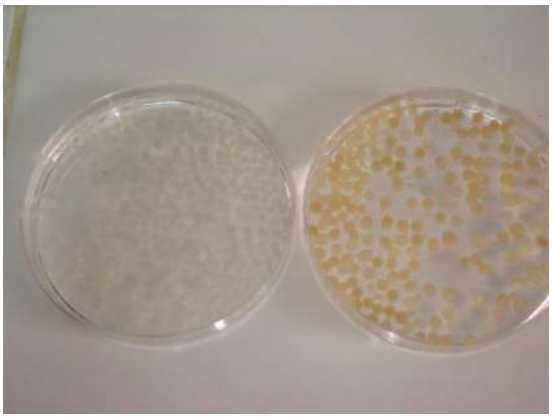


Figure 3.26| Accumulation de produits polymérisés par la réaction enzymatique à l'intérieur des billes.

3.5 Conclusion-Comparaison de performance des deux procédés enzymatiques

Afin de comparer les performances des deux procédés enzymatiques. Sous les conditions optimales du point de vue de rendement et de la vitesse initiale résultantes durant l'étude décrite précédemment, nous avons récapitulé les résultats dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4|Conditions optimales de la biodégradation du phénol par les deux procédés enzymatiques.

Paramètres	**Peroxydase libre**	**Peroxydase immobilisée**
pH	7	8
T(°C)	40	40
$\mathbf{V_0}$(mM/s)	0,038	0,0037
$\mathbf{[phénol]_0}$(mg/l)	80	46
$\mathbf{[H_2O_2]_0}$(mM)	24	13
$\mathbf{[H_2O_2]_0/\ [phénol]_0}$	28	27
$\mathbf{AE_t}$(UI/ml)	**7**	5
Nombres des billes de peroxydase	---	50
Temps de traitement (mn)	180	165
R(%)	93	93,6
$\mathbf{[phénol]_f}$(mg/l)	5,4	2,76

Le tableau 3.4 montre que le procédé de la biodégradation du phénol par l'enzyme libre présente des performances capitales par apport à l'enzyme encapsulé sur les termes de vitesse et la concentration initial du phénol sous l'application des mêmes conditions initiales .Le rapproche entre les deux procédés a été atteint par l'augmentation des nombres des billes de la peroxydase.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail a eu pour objectif l'étude de la biodégradation d'un composé phénolique par procédé enzymatique , où le biocatalyseur est la péroxydase libre et immobilisée dans l'alginate de calcium.

Nous avons choisi les conditions opératoires pour les deux procédés enzymatiques. Nous pouvons, toutefois, considérer que ce qui a été obtenu, tant sur le plan du rendement de l'opération que sur celui de sa cinétique, est acceptable.

La première partie du travail a été consacrée sur des études qui a été réalisées avec l'enzyme sous forme libre ont permis de choisir les conditions optimales de biodégradation du phénol par la peroxydase libre ;

Les résultats obtenus ont montré que ce procédé permet d'atteindre un taux d'abattement de l'ordre de 93 %, après 180 h de traitement. Ce rendement a été obtenu sous les conditions optimales suivantes :Le pH et la température du milieu égal 7 et 40 °C respectivement, la concentration du phénol = 80 mg/l, la concentration de la peroxyde d'hydrogène est de 24mM avec une activité enzymatique totale de l'ordre de 7 UI/ml.

Pour améliorer la stabilité de l'enzyme et favoriser la réaction en augmentant la probabilité de rencontre entre les substrats (phénol, peroxyde d'hydrogène) et l'enzyme, l'enzymea été immobilisée sur l'alginate de sodium. L'influence de différents paramètres opératoires sur ce procédé a été étudiée dans la deuxième partie du travail. Ce procédé a permis l'élimination quasi-totale du phénol, le meilleur taux d'abattement est de 93,6 % obtenu dans les conditions opératoires suivantes: concentrations de phénol et de peroxyde d'hydrogène égales à46 mg/l et 13 mM respectivement, l'activité enzymatique totale =5 UI/ml, nombre des billes de peroxydase =50billes, temps de contact=180 minutes, pH du milieu = 8, avec une température de 40 °C.

Ce travail constitue une ébauche pour des études approfondies sur la biodégradation des effluents phénoliques par les procédés enzymatiques. Il est impératif de compléter les résultats obtenus en suggérant d'autres perspectives de développement ou d'amélioration telles que :

- Immobilisation sur d'autres supports afin de limiter les fuites et les contraintes difusionnelles et garantir une meilleure stabilité chimique ou mécanique du support.
- Couplage de traitement enzymatique avec des méthodes physicochimiques afin d'améliorer le rendement de décoloration.

- L’ajout des intermédiaires (activateurs) qui permettent l'amélioration de la dégradation des composées phénoliques .

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents pour leur soutien, leur aide, leur patience et surtout leur amour.

À ma sœur AMEL.

À mes frères ABD ALNOUR et MOHAMED.

À mon grand père.

À mes grandes mères.

À mes chers : NADJET, WISAM, SOULAF, IBTISAM, MERIEM, RAOUF, CHOUAIB, ABD ALILAH.

Toute la famille BOUHNNICHE et LATRECH sans exception.

À ma chère amie et binôme MERIEM.

À ma très cher amie et sœur FELLA.

À mes amies : SAMIA, AICHA,TOUBA, SOUHILA, HAFIDA, AMINA,FATIMA, AMEL.

À mon promotion du master du bioprocédés pharmaceutiques 2012- 2013.

À mes chers professeurs et maîtres du primaire jusqu'aux études supérieurs.

Hamida.

Dédicaces

Au Dieu tout puissant qui m'a donnée la volonté et m'a mise Sur le chemin du savoir.

Je dédie ce travail à mes précieux parents qui ont consacré tout ce qu'ils possèdent pour ma réussite.

À mes adorables sœurs : Selma, Nadjet et Iméne .

Aux familles AZIZI et SLIMANI.

À mes meilleures amies : Asmaa ; Amina ; Hafida ; Fatima ; Besma ; Selma et Souhila qui m'ont encouragée inlassablement.

À mon binôme Hamida.

A toutes la promotion du Master du bioprocédés pharmaceutiques (2012-2013).

À vous tous je vous dis merci d'être toujours là pour moi.

Meriem.

BIODEGRADATION OF PHENOL BY FREE AND IMMOBILIZED TURNIP PEROXIDASE

Ahmed AZIZI*, **, Mahmoud ABOUSEOUD**, Hamida BOUHENICHE** and Meriem AZIZI**

*Univ. Medea, District Ain D'Heb, 26000 Medea, Algeria-

email: aziziahmed2010@gmail.com

*, **Lab. Transport Phenomena and Biomaterials, District Ain D'Heb, Medea, Algeria.

RÉSUMÉ.*Le présent travail est une étude comparative de la biodégradation enzymatique du phénol par la peroxydase du navet blanc sous formes libre et immobilisée dans l'alginate de calcium.

Les effets de certains facteurs sur le bioprocédé tel que le pH, la température, les concentrations de peroxyde d'hydrogène, du phénol et l'activité de l'enzyme ont été évalués afin d'optimiser les conditions d'élimination du phénol.

Les résultats ont montré que le rendement moyen atteint est de l'ordre de 93 % pour une concentration en phénol de 80 mg/l avec l'enzyme libre et 46 mg/l avec l'enzyme immobilisée.

La durée de traitement était de 3 heures. La réaction est menée en milieu aqueux à pH optimal de 7 et 8 respectivement et température de 40 °C.

ABSTRACT.*This paper is a comparative study of phenol biodegradation by free and alginate entrapped turnip peroxidase.*

The effects of relevant factors on the process such as pH, temperature, concentration of H_2O_2, phenol concentration and enzyme activity were evaluated in order to optimize the conditions for removal of phenol.

Results showed that the obtained average yield is 93% for phenol concentration of 80 mg /l with free enzyme and 46 mg/l with immobilized enzyme. The process duration is 3 hours. The reaction is conducted in aqueous medium under optimal pH between 7 and 8 respectively and temperature of 40 °C.

MOTS-CLÉS : *Phénol; Optimisation; Biodégradation; Peroxydase libre; Peroxydase immobilisée.*

KEYWORDS: *Phenol; Optimization; Biodegradation; Peroxidase; Immobilized.*

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La production de déchets dangereux provenant des industries est devenue un grave problème partout dans le monde. Sous la pression des autorités gouvernementales les industriels sont obligés de prendre des mesures pour limiter la quantité et la toxicité des effluents industriels.

Ces déchets sont générés par de nombreuses industries telles que la pétrochimie, l'industrie pharmaceutique, l'industrie chimique…**, (Kujawski et al. 2004; Rubalcaba et al. 2007)**. Il est nécessaire de les traiter avant de les rejeter dans l'environnement afin de limiter leurs effets polluants.

Au cours de ces dernières années, les méthodes d'élimination et de transformation des composés phénoliques se sont considérablement développées **(Busca et al.2008; Duran et Esposito 2000; D'Annibale et Gianfreda 2002;Karam et Nicell 1997)**. Les techniques de traitement par voie chimique peuvent générer des produits secondaires qui sont parfois plus toxiques que le substrat originel. La biodégradation des composés phénoliques par les microorganismes est intéressante en particulier l'utilisation des moisissures filamenteuses **(Gerin et al. 1995)**mais cela reste limité au traitement d'effluents dilués car les composés phénoliques ont des effets antimicrobiens notables. Les procédés mettant en œuvre non plus des cellules vivantes mais plus simplement des enzymes apparaissent comme une alternative intéressante lorsque les concentrations en phénols sont plus importantes **(Gomez et al. (2006).** Parmi les nombreuses enzymes, potentiellement utilisables pour dégrader les composés phénoliques, les peroxydases sont les plus intéressantes car elles sont actives vis-à-vis d'un grand nombre de composés phénoliques en utilisant simplement l'oxygène dissous dans le milieu**(Karam et Nicell 1997).**Ainsi sous l'action de la peroxydase et en présence d'oxygène, ces contaminants sont transformés en radicaux libres qui polymérisent, conduisant alors à des molécules insolubles qui peuvent être éliminées par des techniques de séparation classiques (filtration, sédimentation ou centrifugation)**(Edwards et al. 1999)**.

D'un point de vue économique, pour limiter les coûts de mise en œuvre des peroxydases, il est intéressant de les utiliser sous forme immobilisée ce qui permet de les utiliser plus d'une fois. Parmi les différents supports d'immobilisation possibles, le greffage des enzymes par inclusion. L'enzyme fixée se présente sous forme de billes, de capsules, de membranes qui assurant à la fois la fonction catalytique et la fonction séparatrice (rétention de l'enzyme).

Ce travail s'inscrit comme ***une contribution à l'étude du traitement des eaux polluées en phénol par la peroxydase libre et immobilisée extraite par le navet blanc***.

Par conséquent, pour atteindre ces objectifs, il est important de faire une étude bibliographique exposée ***au premier chapitre*** afin de mieux situer notre contribution. Cette synthèse se compose de :

- La toxicité, l'écotoxicité du phénol et de ses dérivés dans le milieu aquatique.
- L'état de l'art sur les différentes méthodes de traitement des solutions phénolées deseaux chargées en phénol. Deux types de procédés permettent le traitement de solutions phénolées : les techniques destructives et les techniques non destructives.

Le deuxième chapitre est consacré à une étude descriptive des enzymes. Pour cela nous définissons le concept des enzymes, les différents types d'immobilisations. Nous expliquons également les principaux facteurs influençant ces types de bioprocédés.

Dans le troisième chapitre, nous décrivons dans *un premier temps* l'optimisation de la biodégradation du phénol aqueuse par la peroxydase sous leur forme libre. Plusieurs paramètres sont étudiés : le pH de la solution, la température du milieu, les concentrations de phénol et de peroxyde d'hydrogène, l'activité enzymatique et le temps du contact a été étudiée.

Dans le quatrième chapitre, nous décrivons l'optimisation de la biodégradation du phénol aqueuse par la peroxydase sous leur forme immobilisée par l'alginate de sodium .Les mêmes facteur sont été étudiés sauf l'ajout de l'impact de nombre des billes et la réutilisation des capsules de peroxydase.

Une **conclusion générale** clôturera ce mémoire.

Liste des Abréviations

Abréviation	***Signification***
D.O	Densité optique
EEB	Extrait Enzymatique Brut
EEPP	Extrait Enzymatique Partiellement Purifié
HRP	Horseradish Peroxidase
Lip	Lignine-peroxydase
4-AAP	4-AminoAntiPyrine

Nomenclature et symboles

Lecture	***Désignation***	***Unité***
AE	Activité Enzymatique.	*(UI/ml)*
AS	Activité Spécifique.	*(UI/mg)*
A_f	Absorbance final de solution aqueuse	*(-)*
A_i	Absorbance initial de solution aqueuse	*(-)*
E	Enzyme	*(-)*
K_1, K_2, K_{-1},	Constantes de vitesses	
K_m	Constante de Michaelis–Menten	*(unité de concentration)*
P	Produit	*(-)*
R^2	Coefficient de corrélation	*(-)*
R	Rendement de dégradation	*(%)*
S	Substrat	*(-)*
T	Température	*(°C)*
V	Vitesse	*(UI/l)*

Lettres Grecques

Lecture	**Désignation**	**Unité**
λ	Longueur d'onde	*(nm)*
$\mathcal{E}$	Coefficient d'extinction molaire	*(L.cm/ mol)*

Indices

Lecture	**Désignation**
C	Critique
F	final
I	Initial
Max	Maximal
Opt	Optimal

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adak A. et Pal, A. (2006).** Removal of phenol from aquatic environment by SDS-modified alumina: Batch and fixed bed studies. Separation and Purification Technology 50(2): 256-262,
2. **Ahmadi A. (2010).** Transformation enzymatique des colorants azoïques par la peroxydase libre et immobilisée, Mémoire de Magister, université de Médéa.
3. **ATSDR. (2003).**Management guidelines for phenol. Agency for Toxic Substances and Disease Registry
4. **ATSDR. , (2007)**. Notice of the revised priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profiles. Agency for Toxic Substances and Disease Registry
5. **ATSDR. , (2008)** .Toxicological profile for phenol. Agency for Toxic Substances and Disease Registry
6. **ATSDR. , (2009).** Priority data needs for phenol. Agency for Toxic Substances and Disease Registry
7. **Augère B. (2001).** les enzymes biocatalyseur protéique
8. **Babich, H, et Davis D. L. , (1981).**Phenol: a review of environmental and health risks. Journal Regulatory Pharmaceutical Toxicology **1**: 90-109
9. **Barrios-Martinez A., Barbot M., Moulin P. et Roche. N. , (2006).**Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR. Journal of Membrane Science **281**(1-2): 288-296
10. **Barrios-Martinez, A., Barbot, Marrot, B., Moulin, P, et Roche N. (2006)**. Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR. Journal of Membrane Science **281**(1-2):288-296,
11. **Boaventura R. A. et Macedo E. A. (2008),** Kinetic modelling and simulation of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes. Bioresource Technology 99(11): 4768-4774,
12. **Borel J. P. et Randoux A. (1987).** Biochimie Dynamique.Paris,
13. **Borja R., Alba J. et Banks C. J. (1997),** Impact of the main phenolic compounds of olive mill wastewater (OMW) on the kinetics of acetoclastic methanogenesis. Process Biochemistry **32**(2): 121-133
14. **Capasso R., Evidente A., Schivo I., Orru G., Marciallis M. A., Cristinzo G. et Appl J. (1995),** Antibacterial polyphenols from olive mill waste waters. Journal of Applied Bacteriology **79**: 393-398
15. **Carr P. et L. Bowers (1980).** "Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry. Fundamentals and applications." New York, John Wiley and Sons, Inc.
16. **Charinpanitkul T., Limsuwan P., Chalotorn C., Sano N., Yamamoto T., Tongpram P., Wongsarivej P., Soottitantawat A. et Tanthapanichakoon W. (2010),** Synergetic removal of aqueous phenol by ozone and activated carbon within three-phase fluidized-bed reactor. Journal of Industrial and Engineering Chemistry **16**(1): 91-95.
17. **Chen R., Jiang H., Jin W. et Xu N. (2009**), Model Study on a SubmergedCatalysis/Membrane Filtration System for Phenol Hydroxylation Catalyzed by TS-1. Chinese Journal of Chemical Engineering **17**(4): 648-653.
18. **Cheng J., Ming Yu S. et Zuo P. (2006),** Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. Water Research **40**(2): 283-290.
19. **Cohen S., Belinky P. A., Hadar Y. et Dosoretz C. G. (2009),** Characterization of catechol derivative removal by lignin peroxidase in aqueous mixture. Bioresource Technology 100(7): 2247-2253].
20. **Cooper V. A. et Nicell J. A. (1996),** Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. Water Research **30**(4): 954-964.
21. **D'Annibale A., Stazi S. R., Vinciguerra V. and GiovannozziSermanni G. (2000),** Oxirane-immobilized Lentinulaedodeslaccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. Journal of Biotechnology 77(2-3): 265-273,
22. **Dixon, M. et E. Webb (1971).** "Enzymes." London, Longman Group Limited

23. **Duran N. et Esposito E. (2000),** Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Applied Catalysis B: Environmental **28**(2): 83-99.

24. **Duran N. et Esposito E. (2000),** Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Applied Catalysis B: Environmental **28**(2): 83-99.

25. **Ehlers G. A. et Rose P. D. (2005),** Immobilized white-rot fungal biodegradation of phenol and chlorinated phenol in trickling packed-bed reactors by employing sequencing batch operation. Bioresource Technology **96**(11): 1264-1275

26. **El Hajjouji H., Fakharedine N., Ait Baddi G., Winterton P., Bailly J. R., Revel J. C. et Hafidi M. (2007),** Treatment of olive mill waste-water by aerobic biodegradation: An analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. Bioresource Technology **98**(18): 3513-3520.

27. **ETSC**. **(2008).** "Seuils de toxicité aiguë-phénol." Expertise Toxicologique des Substances Chimiques.

28. **ETSC. (2008).** "Seuils de toxicité aiguë-phénol." Expertise Toxicologique des Substances Chimiques

29. **Galindez-Mayer J, Ramon-Gallegos J, Ruiz-Ordaz N, Juarez-Ramirez C,Salmeron-Alcocer A. et Poggi-Varaldo H. M. (2008),** Phenol and 4-chlorophenol biodegradation by yeast Candida tropicalis in a fluidized bed reactor. Biochemical Engineering Journal **38**(2): 147-157.

30. **Gérard D. (2012) :** Lycée Faidherbe de LILLE février 2012

31. **Gomez J. L., Bodalo A., Gomez E., Bastida J., Hidalgo A. M. et Gomez M. (2006),** Immobilization of peroxidases on glass beads : an improved alternativefor phenol removal. Enzyme and Microbial Technology **39**(5): 1016-1022.

32. **GUEDIRA F. (2005).** Université Mohammed V-Agdal / FSR/ Master de sciences analytiques/ M9/ cours de Spectroscopie

33. **Guisan J.M.,** Immobilization of enzymes and cells; Humana Press Inc ; Totowa, 2006.

34. **Guohua C. (2004),** Electrochemical technologies in wastewater treatment. Separation and Purification Technology **38**(1): 11-41.

35. **Handbook . (2004).**" Chemistry and physics." Handbook, 84TH, (CRC Press).

36. **Hartmeier, W. (1988).** "Immobilized biocatalysts: An introduction." Berlin, Springer-Verlag.

37. **Huang, J., Wang, X., Jin, Q., Liu, Y, et Wang, Y. (2007).**"Removal of phenol from aqueous solution by adsorption onto OTMAC-modified attapulgite." Journal of Environmental Management **84**(2): 229-236,

38. **Huang, Y., Ma, X., Liang, G, et Yan, H. , (2008)."**Adsorption of phenol with modified reactorite from aqueous solution." Chemical Engineering Journal **141**(1-3): 1-8

39. **Iamarino G., Rao M. A. et Gianfreda L. (2009),** Dephenolization and detoxification of olive-mill wastewater (OMW) by purified biotic and abiotic oxidative catalysts. Chemosphere 74(2): 216-223

40. **INERIS. (2005).** "Phénol: Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques." Institut National de l'Environnement Industriel et des risques,

41. **INRS. (1997)."**Fiche toxicologique." n°15 Institut National de Recherche et de Sécurité,

42. **INRS**. **(2008).**"Fiche Toxicologique." Institut National de Recherche et de Sécurité.

43. **Jiang, H., Fang, Y., Fu, Y, et Guo, Q-X., (2003).**"Studies on the extraction of phenol in wastewater." Journal of Hazardous Materials **101**(2): 179-190

44. **Karam J. and Nicell J. A. (1997),** Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology **69**: 141-153.

45. **Kennedy L. J., Vijaya J. J., Kayalvizhi K. et Sekaran G. (2007),** Adsorption of phenol from aqueous solutions using mesoporous carbon prepared by two-stage process. Chemical Engineering Journal **132**(1-3): 279-287.

46. **Kennedy, J. F., E. H. M. Melo, et al. (1990).** "Immobilized enzymes and cells." Chem.Engin. Progress 87(7): 81-89.

47. **Kobayashi S., Rittet H., Kaplan D.(2006).,** Enzyme-catalysed synthesis of polymers.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg

48. **Kujawski, W., Warszawski, A., Ratajczak, W., Porebski, T., Capala, W, et Ostrowska, I. , (2004 a).**"Application of pervaporation and adsorption to the phenol removal from Wastewater." Separation and Purification Technology **40**(2): 123-132

49. **Kunz A., Reginatto V. et Duran N. (2001),** Combined treatment of textile effluent using the sequence Phanerochaete chrysosporium-ozone. Chemosphere **44**(2): 281- 287.

50. **Luke A. K. et Burton S. G. (2001),** A novel application for Neurospora crassa :Progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols. Enzyme and Microbial Technology **29**(6-7): 348-356.

51. **Martirani L., Giardina P., Marzullo L. et Sannia G. (1996),** Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus Pleurotus ostreatus. Water Research **30**(8): 1914-1918.

52. **Mathieu, J-M. (2002)**."Phénol. Acétone. α-Méthylstyrène." Techniques de l'Ingénieurs : J 6490,

53. **Mohanty, K., Jha, M., Meikap, B. C, et Biswas, M. N., (2005 b). "**Preparation and characterization of activated carbons from terminalia arjuna nut with zinc chloride activation for the removal of phenol from wastewater." Industrial & Engineering Chemistry Research **44**: 4128-4138

54. **Morawski A. W., Janus M., Tryba B., Inagaki M. et Ka□ucki K. (2004),** TiO2-anatase modified by carbon as the photocatalyst under visible light. Comptes Rendus Chimie **9**(5-6): 800-805.

55. **Negishi N., He F., Matsuzawa S., Takeuchi K. et Ohno K. (2008),** Wave-guide type photoreactor for water purification. Comptes Rendus Chimie **9**(5-6): 822-828

56. **Pan G. et Kurumada, K-I. , (2008).**"Hybrid gel reinforced with coating layer for removal of phenol from aqueous solution." Chemical Engineering Journal **138**(1-3): 194-199

57. **Perrin R. et Scharff, J-P. (1993).** "Chimie industrielle 1." Livre, Paris, (Masson): 142-526,

58. **Qingguo H. et Walter J. W. (2005),** Transformation and removal of Bisphenol A from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling reactions : efficacy,products, and pathway. Environ. Sci. Technol. **39**(16): 6029-6036.

59. **Rageul P. (1991),** Etude de l'adsorption du phénol sur charbons actifs a partir de la phase aqueuse. Polymères-Interfaces-Etats Amorphes. Montpellier, Université des Sciences et Techniques du Longuedoc-Montpellier II**:** 1-47.

60. **Rubia T., Lucas M. et Martínez J. (2008),** Lignin modifying enzymes of Coriolopsispolyzona and their role in olive oil mill
wastewaters decolourisation.

61. **Safa chaouche A. et GuerromiL., (2010).** Dégradation enzymatique des composes phénoliques par la peroxydase, Mémoire de Master, Université de Médéa.

62. **Sano N., Yamamoto T., Yamamoto D., Kim S.-I., Eiad-Ua A., Shinomiya H. et Nakaiwa M. (2007),** Degradation of aqueous phenol by simultaneous use of ozone with silica-gel and zeolite. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification **46**(6): 513-519.

63. **Scioli C. et Vollaro L. (1997),** The use of Yarrowialipolytica to reduce pollution in olive mill wastewaters. Water Research 31(10): 2520-2524,

64. **SFC., (2009).** "Données industrielles, économiques, géographiques sur les principaux produits chimiques, métaux et matériaux." Société Française de Chimie, 8e Edition.

65. **Silvia FABIANO 2002 : «**Immobilisation D'enzymes dans des films de polymere conducteur : le pedt .application a la realisation de biocapteurs amperometriques pour le dosage du glucose et des compose phenoliques

66. **SPDD. du 20 décembre 2001** "Legifrance.gouv.fr." Service Public de la Diffusion du Droit, Décret n° 2001-1220

67. **Sponza D. T. (2003).**Application of toxicity tests into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. Ecotoxicology and Environmental Safety 54(1): 74-86.

68. **Staples C. A., Dome P. B., Klecka G. M., Oblock S. T. et Harris L. R. (1998),** A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. Chemosphere

36(10): 2149-2173

69. **Stoilova I., Krastanov A., Stanchev V., Daniel D., Gerginova M. et Alexieva Z. (2006),** Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol by Aspergillus awamori cells. Enzyme and Microbial Technology **39**(5): 1036-1041.

70. **Stoilova I., Krastanov A., Yanakieva I., Kratchanova M. et Yemendjiev H. (2007),** Biodegradation of mixed phenolic compounds by Aspergillus awamori NRRL 3112. International Biodeterioration & Biodegradation **60**(4): 342-346.

71. **Svobodova K., Majcherczyk A., Novotny C. et Kues U. (2008**), Implication of mycelium-associated laccase from Irpexlacteus in the decolorization of synthetic dyes. Bioresource Technology 99(3): 463-471],

72. **Tawabini B. et Zubair A. (2011),** Bromate control in phenol-contaminated water treated by UV and ozone processes. Desalination **267**(1): 16-19.

73. **Throop W. M. (1975),** Alternative methods of phenol wastewater control. Journal of Hazardous Materials **1**(4): 319-329.

74. **ToscanoG., Colarieti M. L. et Greco G. (2003),** Oxidativepolymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives. Enzyme and Microbial Technology 33(1): 47-54.

75. **Tran-Minh, C. (1991).** "Les biocapteurs. Principes, construction et applications." Paris, Masson

76. **Vasu, A. E. , (2008).**"Removal of Phenol and o-Cresol by Adsorption onto Activated Carbon." EJournal of Chemistry **05**: 224-232

77. **Wagner M. et Nicell J. A. (2001),** Treatment of a foul condensate from kraft pulping with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. Water Research **35**(2): 485-495.

78. **We et al l, H. (1975).** "Immobilized enzymes, antigens, antibodies, and peptides. Preparation and caracterization." New York, Marcel Dekker Inc.

79. **Yahia A A. (2009),** Adsorption kinetics and performance of packed bed adsorber for phenol removal using activated carbon from dates' stones. Journal of Hazardous Materials **170**(2-3): 763-770.

80. **Yu J., Taylor K. E., Zou H., Biswas N. et Bewtra J. K. (1994),** Phenol Conversion and Dimeric Intermediates in Horseradish Peroxidase-Catalyzed Phenol Removal from Water. Environmental Science and Technology **28**(12): 2154-2160.

81. **Zaborsky, O. (1974).** "Immobilized enzymes." Ohio, CRC Press.

82. **Zumriye A. et Yener J. (2001),** A comparative adsorption/biosorption study of mono-chlorinated phenols onto various sorbents. Waste Manage **21**: 695-702

Remerciements

Dieu'ALLAH' *merci pour nous avoir donné la santé, la volonté et le courage sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisé.*

T*out d'abord nous exprimons notre gratitude et nos remerciements à M^r* ***Mahmoud Abouseoud*** *notre promoteur de recherche qui n'a jamais cessé de nous prodiguer conseils et encouragements et aussi pour avoir assuré la direction de notre thèse.*

E*n second lieu, nous tenons à remercier sincèrement M^r* ***Ahmed AZIZI*** *notre co-promoteur, pour avoir dirigé ce travail, pour sesprécieux conseils et ainsi pour son aide pendant toute la durée de réalisation de ce travail.*

N*ous sommes très reconnaissantes envers M^lle* ***AffafAhmadi*** *pour sa précieuse aide dans la conduite des expériences.*

J*e tenons à exprimer notre gratitude aux* ***membres du jury*** *d'avoir accepté de juger ce travail de recherche.*

N*otre profond remerciement à tous* ***les laborantins de laboratoire*** *de fermentation de complexe antibiotical de SAIDAL.*

N*ous remercions également* ***l'ensemble des membres du Hall Technologique****.*

N*ous n'omettrons pas de remercier* ***instituteurs et professeurs*** *qui nous ont inculqué le savoir.*

E*nfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

BIODÉGRADATION DU PHÉNOL PAR LA PEROXYDASE LIBRE ET IMMOBILISÉEEXTRAITEA PARTIR DU NAVET BLANC

Résumé

Le présent travail est une étude comparative de la biodégradation enzymatique du phénol par la peroxydase du navet blanc sous formes libre et immobilisée dans l'alginate de calcium.

Les effets de certains facteurs sur le bioprocédé tel que le pH, la température, les concentrations de peroxyde d'hydrogène, du phénol et l'activité de l'enzyme ont été évalués afin d'optimiser les conditions d'élimination du phénol.

Les résultats ont montré que le rendement moyen atteint est de l'ordre de 93 %pour une concentration en phénol de 80 mg/l avec l'enzyme libre et 46 mg/l avec l'enzyme immobilisée. La durée de traitement était de3 heures. La réaction est menée en milieu aqueux à pH optimal de 7 pour la peroxydase libre et 8pour l'immobilisée et température de 40 °C.

Mots clés: *Phénol; Optimisation ; Biodégradation ; Peroxydase libre ; Peroxydase immobilisée.*

BIODEGRADATIONOF PHENOLBY FREE AND IMMOBILIZED TURNIP PEROXIDASE

Abstract

This paper is a comparative study of phenol biodegradation by free and alginate entrapped turnip peroxidase.

The effects of relevant factors on the process such as pH, temperature, concentration of H_2O_2, phenol concentration and enzyme activity were evaluated in order to optimize the conditions for removal of phenol.

Results showed that the obtained average yield is 93% for phenol concentration of 80 mg/l with free enzyme and 46mg/l with immobilized enzyme. The process duration is 3 hours. The reaction is conducted in aqueous medium under optimal pH between 7 and 8 respectively and temperature of 40 °C.

Keywords: *Phenol; Optimization; Biodegradation; immobilized peroxidase; free peroxidase.*

التحلل البيولوجي للفينول بواسطة انزيم البروكسدار الحر و المثبت المستخلص من اللفت.

الملخص

هذا العمل عبارة عن دراسة مقارنة للتحلل الإنزيمي للفينول بواسطة البيروكسيداز الحر و المثبت المستخلص من اللفت الأبيضحيث تم تقييم تأثير بعض العوامل مثل درجة الحموضة و درجة الحرارة و تركيز الفينول و تركيز بيرو كسيد الهيدروجين و نشاط الأنزيم من اجل تحديد الشروط المثالية لعمل البيروكسيداز الحر و المثبت.

كان المردودالمتحصل عليه93%من اجل تركيز الفينول يساوي80مغ/ل مع البيروكسيداز الحر و46مغ/ل مع البيروكسيداز المثبت في ظرف3ساعات في و سط مائي و عند درجة حموضة مثالية تساوي 7بالنسبة للبيروكسيداز الحر و 8 بالنسبة للمثبت عند40°مئوية.

كلمات البحث: الفينول؛ بيروكسيداز حر؛ بيروكسيداز مثبت؛ التحلل البيولوجي تحسين .