République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Yahia Fares de Médéa

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés

et Environnement

Mémoire de Master

Étudié par : KAIBI Meriem & ATTARI Nassima

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

Thème

Traitement de bleu de méthylène par procédé couplé l'adsorption et la peroxydase

Soutenu devant le jury :

Dr. TASSIST.A	Maitre de Conférence (A), UYFM	**Présidant**
Mr.BELAISSA.Y	Maitre-Assistant (A), UYFM	**Examinateur**
Mr. AZIZI.A	Maitre-Assistant (A), UATL	**Rapporteur de mémoire**

Année universitaire 2016-2017

Université Yahia Fares-pole universitaire –Médéa – 26000

REMERCIEMENTS

Avant tout nous tenons à remercier «Allah».

A travers ce modeste travail, nous tenons à remercier vivement notre encadreur Monsieur Azizi Ahmed à l'université de Médéa pour la confiance qu'il nous a témoignée, et pour avoir proposé ce sujet et qui n'a cessé de nous guider et nous diriger.

Nous remercions aussi les honorables members de jury madame Tassisst Amina et Monsieur BELAISSA Yahia.

Nous remercions également ingénieur de labo madame Nassima Bouaissa.

Nous exprimons enfin nos gratitudes à tous nos enseignants de l'Université YAHIA FARES De Médéa. Sans omettre bien sur de remercier profondément tous ceux qui ont contribué ou de loin à réalisation du présent travail.

Enfin, merci d'avance à ceux ou celles qui voudront bien nous lirons ou nous écoutons et surtout nous aidons à progresser.

DEDICASES

Je dédié ce modeste travail à mes chèrs parents pour tout leur

amour et leur encouragement qui m'ont toujours aidé pour

que je connaisse la science et la culture.

Sans parler de mon cher mari : Hassen Fortasqui m'a aidé et m'a encouragé et m'a souhaité plein succès merci.

A mes chères soeurs: Hassiba ; Asmaa , Anoussa Nour El yakine

Et mon Cher Samir , je vous aimes énormément.

A mes chères amies : Gassme Djamila, Djlouahi Farah, Gassme Rima.

A tous mes camarades et mes chères cousines : souad ,Naaima ,Zineb, Fatiha, Amine , Elouanes,Elhadje.

A tous ceux qui ont contribué de prés ou de loin à notre formation,

et tous les professeurs de mon cursus.

Attari Nassima

DEDICASES

Avant tout Je dédie ce modeste travail

À ***Mes chers parents***

Á mon cher frère et mes chers sœurs

A mon binôme Nassima

A tous ceux et celles qui me sont chers

Avec toute mon affection

Meriem

الملخص

يندرج ه ذا العمل في إطار دراسة فعالية و استعمال البيروكسيداز النباتي المستخلص و المنقى من اللفت الأبيض في التحلل لصبغة (ازرق المثيلين) .إذ تعتمد الدراسة على تحليل الصبغ أزرق المثيلين باستعمال إنزيم البيروكسيداز الحر المعالج بمحلول الأسيتون و امتزاز الفلين المعدلة بكبريتات الصوديوم دوديسيل. حيث كانت نتائج النشاط الإنزيمي كالتالي:6.87 وحدة دولية/مل و **8.82** وحدة دولية /مل و 14.25 وحدة دولية/مل . كما سمحت النتائج على تحديد العوامل القصوى في تحليل الصبغ ازرق المثيلين عند درجة حموضة تساوي6 وتركيزالماءالاوكسجيني 10مول/ل المردود المحصل عليه في ظل هذه الظروف هو 90 ٪مع البيروكسيداز الحر.

تم تجديد الفلين المعدل عن طريق استخدام محاليل كميائية أساسية و أخرى قاعدية (عضوية ومعدنية)والإنزيم المنقى جزئيا (بيروكسيد اللفت الأبيض) ذو النشاط الإنزيمي.87.6(1- مل) و قد كانت طريقة التجديد الأكثر فعاليه بالإنزيم في ا لنشاط6.87 وحدة دولية/مل حيث أن المحصول وكمية الإمتزاز تستقر تقريبا فيا لمرة 10 من استخدامها.

الكلمات المفتاحية : أزرق المثيلين،الفلين المعدل كيميائيا،الإمتزاز،تجديد

Résumé

Ce travail vise à étudier l'efficacité et l'utilisation de l'enzyme peroxydase végétale extrait et purifiée à partir de navets blancs dans la dégradation d'un colorant textile (méthylène bleu).Cette étude dépend de l'analyse du colorant MB En utilisant l'enzyme peroxydase traitée avec de l'acétone et l'adsorption du liège modifié par sulfate de sodium du dodécyle. Les résultats de l'activité enzymatique étaient AE=6.87UI/ ml ; AE =8.82UI/ ml; AE= 14.25UI/ml

Les résultats peuvent également déterminer les conditions optimale dans l'analyse du bleu de méthylène à un pH de 6 et la concentration de l'eau oxygènée 10 mol/l (pH=6;$[H_2O_2]$=10 mol/l.avec un rendement obtenu dans ces conditions est de l'ordre de 90% avec la peroxydase libre. Aussi La désorption de liège modifiée a été régénérée avec des solutions chimiques basiques et acides et une enzyme partiellement purifiée (peroxyde de navet blanc) avec une activité enzymatique AE = 6,87UI / ml.

La méthode de régénération la plus efficace était l'enzyme avec une activité de 6,87UI/ ml ou le rendement et la quantité d'adsorption était presque stable pour une réutilisation à 10 fois.

Mots clés : Bleu de Méthylène, Liège modifié chimiquement, adsorption, Régénération

Abstract

This Work aims to study the efficiency and use of the plant peroxidase enzyme extracted and purified from white turnips in the degradation of a textile dye (méthyléne bleu).this study depends on the analysis of MB dye By using peroxidase enzyme treated with acetone and Adsorption of cork modified with sodium sulfate dodecyl. the results of the enzymatic activity were AE=6.87UI/ ml ; AE =8.82UI/ ml; AE= 14.25UI/ml … also results could give us the opportunity To determine the maximum factors in the analysis of methylene blue at a pH of 6 and the concentration of oxygen water 10 mol/l (pH=6;[H_2O_2]=10 mol/l.

The yield obtained under these conditions is of the order of is 90% with free peroxidase. Also the modified cork desorption was regenerated by using basic and acid chemical solutions and partially purified enzyme (white turnip peroxide) with an enzymatic activity AE=6.87UI/ml.

The most efficient method of regeneration was the enzyme with an activity 6.87 units mL-1 or the yield and the amount of adsorption was almost stable for 10 reuse.

key words :Methylene Blue, Cork chemically modified, Adsorption, Regeneration.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

DÉDICACES

RÉSUME

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Introduction générale……...1

Chapitre I. Synthèse bibliographiques

I.1. les colorants ……...……...……...…..……3

I.2. Classification des colorants …….....3

I.2.1. Classification technologique ou (appellation usuelle)……..……...…....4

I.2.2. Classification technique ……..…4

I.2.3. Classification selon la constitution chimique……...….5

I.2.4. Classification tinctoriale……..……5

I.2.4.1 Les colorants anioniques ou acides …….....5

I.2.4.2.Les colorants basiques ou cationique…….……...…7

I.2.4.3 Les colorants à mordant ……...…..……7

I.2.4.4 Les colorants directs …….……....7

I.2.4.5. Les colorants réactifs……....….7

I.2.4.6. Les colorants de cuve……..…….……8

I.2.4.7. Colorants métallifères …….…….....8

I.2.4.8. Pigments…….……...…..8

I.3.Colorant thiazine……8

I.4.Colorant étudié……...9

I.4.1.Utilisation de Bleu de méthylène…….…..9

I.4.2.les principales caractéristiques physico-chimiques de ce colorant……..…..9

I.4.3.Propriétés cristallines du bleu de méthylène……...…….10

I.4.4.Toxicité du bleu de méthylène ……..……..11

1.5. Procédés L'adsorption ……...11

I.5.1 Différents types d'adsorption:…….……12

I.5.1.1 L'adsorption physique (physisorption)……..12

I.5.1.2 L'adsorption chimique (chimisorption)…….12

I.5.2. Le mécanisme d'adsorption d'un colorant……..12

I.5.3. Cinétique d'adsorption……13

I.5.4 Isothermes d'adsorption …….……14

I.5.5 Adsorbents……..…….…15

I.5.5.1 Principaux types d'adsorbants……..…….….15

I.5.5.2 Liège ……...……15

I.6.Procédés enzymatiques……16

I.6.1. Peroxydases …….……...17

I.6.1.1 Définition ……...…...17

I.6.1.2.Structure des peroxydases ……..……...17

I.6.1.3. Classification Les peroxydases ……..…….20

a) Peroxydases de classe I …….…….20
b) Peroxydases fongiques extracellulaires (classe II) :……...…….20

c) Peroxydases des plantes, (classe III) :…….……20
I.6.1.4. Applications de la peroxydase ...……..……....20

CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES

II.1 Introduction……24

II.2. Matériels et réactifs……...24

II.2.1. Equipements……...…….24

II.2.2. Verreries ……...……..24

II.2.3. Réactifs…….……...…24

II.3. Méthodes……..25

II.3.1 Méthodes préparation des solutions……....25

II.3.2 Analyse spectroscopique par UV-Visible……..…….25

II.3.3Préparation des solutions tampons……..26

II.3.4. Méthode d'extraction et purification de peroxydase de navet blanc……26

II.3.5. teste de l'activité enzymatique ……..……..…28

II.3.6 Méthode du dosage……..28

II.3.7. modification chimique de poudre du liège…….……29

II.3.8 le PH du point de charge zéro (pH_{PZE}) ……..……..…29

II.3. 9Effet des paramètres opératoires sur la biodégradation du BM par la peroxydase **…...30**

II.3.9.1 Effet du pH :**……**…**……**……..**30**

II.3.9.2 Effet de la concentration du H_2O_2 …….……..….……..…..30

II.3.10 Régénération enzymatique de l'adsorbant …….....……..……31

III.RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1 Introduction ……..……...……..32

III.2 Calcul de l'activité enzymatique…….. 32

III.3 PH de point de charge 0……34

III.4 Effet du pH sur l'élimination du colorant…….35

III.5 Effet du [H_2O_2]……...……..36

III.6 Régénération enzymatique de l'adsorbant ……...37

III.7 Conclusion……... 38

Conclusion générale……....39

Références bibliographiques ……..…...…….40

Liste des figures

CHAPITER I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUES

Figure I-1: Colorant C.I. Acid red 27 ...……...5

Figure I-2: Colorant CI Basic green..…….……..….7

Figure I-3 : Modèle de colorant à mordant ……...7

Figure I-4 : Modèle des colorants directs……..7

Figure I-5 : Colorant de cuve…….…8

Figure I-6 : étape de transfert d'un soluté lors de son adsorption……13

Figure I-7 : Classe d'isothermes d'adsorption d'après GILES ……...…..14

Figure I- 8: Allure des isothermes d'adsorption selon Gilles et al …….……...…..14

Figure I-9: Structure tridimensionnelle des peroxydases ……...…...18

Figure I-10: Structure de Ferriprotoporphyrine IX de la peroxydase de HRP..……..….18

Figure I-11:Mécanisme de catalyse des peroxydases. AH, donneur d'hydrogène…….….18

Figure I-12 : Cycle catalytique de la partie hémine de la peroxydase…….19

CHAPITREII : MATERIELS & METHODES

Figure II-1 : Courbe d'étalonnage du BM……....25

Figure II-2 : préparation de l'extrait enzymatique de la peroxydase de navet blanc……27

Figure II-3 : Modification chimique de liège……29

Figure II-4 : Détermination Le PH du point de charge zéro……...…..30

Figure II-5 : Séparation de l'adsorbat-adsorbant……..31

Figure II-6: observation finale de lavage et la filtration……...31

CHAPITREIII : RÉSULTATS ET DISCUSSION

Figure III-1 : activité enzymatique pour l'extrait $EEPP_1$…….……...…32

Figure III-2 : activité enzymatique pour l'extrait $EEPP_2$…….……...33

Figure III-3: activité enzymatique pour l'extrait $EEPP_3$…….…..……...33

Figure III-4 : Le point charge zéro (pH_{PZC}) de liège modifié……..…...…….……..34

Figure III-5 : Effet de pH sur bleu de méthylène par la peroxydase…….……...35

Figure III-6 : Effet de [H_2O_2] sur bleu de méthylène par la peroxydase ……..……...36

Figure III-7 : Effet de [H_2O_2] sur bleu de méthylène par la peroxydase……...37

Figure III-8 : Réutilisation de liège modifié lors d'adsorption de bleu de méthylène avec l'enzyme……..…....38

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Groupes chromophores et classes des colorants……...……...…3

Tableau I-2 : les principaux class selon structure chimique repose sur la nature du groupe chromophore……...6

Tableau I-3 : caractéristiques physico-chimiques de BM……...10

Tableau I-4 : Propriétés cristallines du bleu de BM……10

Tableau I-5: caractéristiques des principaux adsorbants industriels……...15

Tableau I-6:Principales applications des peroxydases végétales dans le traitement des colorants et effluents textiles…….22

Liste des abréviations

Abréviations	Significations
AsP	ascorbate peroxydase
Cap	les catalase-per-oxydases
Ccp	cytochrome c peroxidase
BGP	Bitter gourd peroxidase
CI	Colour Index
DO	Densité optique
DO_i	Densité optique initial
DO_f	Densité optique finale
E	Enzyme
EEB	Extrait Enzymatique Brut
EEPP	Extrait Enzymatique Partiellement Purifié
IRTF	infrarouge à transformée de Fourier
HRP	horseradish peroxidase
LiP	Lignine peroxydase
MB	le bleu de méthylène
MnP	Manganèse peroxydase
pH	Potentiel hydrique
pH_{opt}	Potentiel hydrique optimale
pH_{PZC}	PH du point de charge zéro
POX	peroxydase native
WRF	White rot fungi
SDS	sulfate de sodium du dodécyle

,

Nomenclatures et symboles

symboles	significations	Unités
AE	Activité Enzymatique	UI/ml
C0	Concentration initiale de l'adsorbat	mg/ l
Ce	Concentration à l'équilibre de l'adsorbat	mg/ l
Ve	Volume de l'extrait enzymatique,	ml
Vr	Volume réactionnel	ml
T	Température	°C
t	temps	min
λ_{max}	Longueur d'onde (nm)	nm
R	Rendement d'adsorption	%
K	Constantes cinétiques de la formation	-
a, b et c	Paramètres de la maile	A°
β	Angle du système monoclinique.	$A°^3$.
U	Colume du cristal	A°
Z	La coordinance.	-

Introduction générale

Introduction générale

Les colorants sont utilises dans de nombreux secteurs industriels tels que les teintures du textile, du papier, du cuir et dans les industries alimentaires et cosmétiques [1]**.** Ils ont la réputation d'être des substances toxiques et persistantes dans l'environnement ; parmi ces colorants ya le bleu de méthylène qui est provoqué des brulures oculaires responsables de blessures permanentes aux yeux de l'homme et des animaux. Son inhalation peut donner lieu à des difficultés respiratoires et son ingestion par la bouche produit une sensation de brulure, provoque des nausées, des vomissements, transpiration et sueurs froides abondantes **[2]**

Le traitement des rejets industriels contenant ce type de colorant s'avère d'un grand intérêt et une large variété de techniques, physiques, chimiques et biologiques a été développée et testée dans le traitement des effluents charges en colorants Ces procèdes incluent la floculation, la précipitation, l'échange d'ions, la filtration sur membrane, l'irradiation et l'ozonation, Cependant, ces procèdes sont couteux et conduisent a la génération de grandes quantités de boues ou a la formation de dérives [3]. Et Parmi les procèdes de traitement des rejets liquides, on a l'adsorption qui reste une technique relativement utilisée et facile a mettre en œuvre. Le charbon actif est l'adsorbant le plus largement utilise en raison de sa grande capacité d'adsorption des matériaux organiques [4]. Par ailleurs, la régénération du charbon actif est elle aussi une opération délicate et ne fait pas l'unanimité sur son utilité, aussi a un cout élève et reste difficile a régénérer. Des nombreux des chercheurs se sont tendance a focalisés sur la préparation de certains adsorbants à partir de déchets naturels d'arbres fruitiers, de palmiers ou encore la sciure de bois, pour les utiliser en qualité d'adsorbants, en vue de remplacer le charbon actif Toutefois, pour que l'utilisation de ces adsorbants devienne plus effective [4,3,5].

Notre recherche se sont orientée vers l'étude des mécanismes régissant la fixation de bleu de méthylène sur liège modifié chimique par une tension active (SDS), qui régénéré par un enzyme partiellement purifié et par des solutions chimiques. Il est évident que l'interaction entre les colorants et ces adsorbants dépend du type de groupements réactifs sur la molécule du colorant, ainsi que les fonctions de surface que renferme le solide.

Notre mémoire, comportera les étapes suivantes :

1. La premier chapitre était sur une synthèse bibliographique qui rassemble :

- Les données essentielles sur les colorants, puis un aperçu sur les différentes méthodes de traitement des effluents colorés en particulier par la voie enzymatique par la méthode classique l'adsorption et on parle aussi sur quelque adsorbant tel que le Liège.
- Ensuite nous avons discuté les différentes caractéristiques d'enzyme la peroxydase.

2. On a cité dans la deuxième chapitre le matériel et les méthodes utilisés tel que :

- Méthodes d'extraction et purification de la peroxydase du de navet blanc.
- Modification chimique de poudre du liège par une tension active a été utilisée dans l'élimination de bleu de méthylène dissous dans l'eau
- une étude de régénération de l'adsorbant a été effectué avec un enzyme partiellement purifié

3. La troisième chapitre s'intéresse essentiellement à la discussion des résultats obtenus.

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

Chapitre I. synthèse bibliographiques

I.1 les colorants

Un colorant est une matière colorée par elle-même ;capable de se fixer sur un support.la coloration plus ou moins intense des différents substances est liée à leur constitution chimique [6].En effet, selon le type d'application et d'utilisation, les colorants doivent répondre à un certain nombre de critères afin de prolonger la durée de vie des produits textiles sur les quels ils sont appliqués: résistance à l'abrasion, stabilité photolytique des couleurs, résistance à l'oxydation chimique (notamment les détergents) et aux attaques microbiennes. Les propriétés colorantes des composés organiques dépendent de leur structure. La coloration est principalement due à la présence de groupes chimiques insaturés appelés chromophores. Les colorants doivent pouvoir pénétrer dans la matière à colorer et s'y fixer durablement. Certains radicaux chimiques, les auxochromes , fixent avec efficacité le colorant souhaité sur le support. (Groupe chromophores classés dans le tableau I.1).

Tableau I-1 Groupes chromophores et classes des colorants. [7]

Groupements chromophores	Groupements auxochromes
Azo (-N=N-)	Amino (-NH2)
Nitroso (-NO ou –N-OH)	Méthylamino (-NHCH3)
Carbonyl (=C=O)	Diméthylamino (-N(CH3)2)
Vinyl (-C=C-)	Hydroxyl (-HO)
Nitro (-NO2 ou =NO-OH)	Alkoxyl (-OR)
Sulphure (>C=S)	Groupements donneurs d'électrons

I.2. Classification des colorants

Il existe seulement une dizaine de colorants naturels, alors que l'on compte des milliers de colorants synthétiques [8].les principe de classification les plus couramment rencontres dans les industries textiles, sont basées sur les structures chimique des colorants synthétiques et sur les méthodes d'applications aux déférents substrats (textiles, cuire, matières plastique). [9] L'ouvrage de référence en termes de colorants et pigments est le Colour Index (CI), publié par la Society of Dyers and Colourists. Il se décline en différents volumes et fait l'objet d'une mise à jour régulière. Deux systèmes de nomenclature sont indiqués par le CI :

- **Un nom générique (C.I. Generic Name)** y est attribué à chaque colorant, incorporant sa classe d'application ainsi qu'un nombre de cinq chiffres, relatif à sa structure chimique (C.I. Number).

- **Le second système est le (C.I name)**, il indique la classe chimique, la couleur et un nombre d'identification. Ce système de nomenclature est relativement universel et permet une compréhension simplifiée au sein d'un milieu complexe de noms commerciaux historiques et modernes. [9]

I.2.1. Classification technologique ou (appellation usuelle)

elle permet à l'utilisateur de connaitre le mode d'application du colorant, et donc ses domaines d'utilisation, ses propriétés (solubilité, affinités pour tel type de fibres ou matériaux, nature de la fixation …..).. Cette classification comprend trois éléments :La couleur ;Le nom générique de la classe d'application ;Le numéro d'ordre chronologique d'inscription au « CI ». [9]

I.2.2. Classification technique

On peut classer les colorants organiques en deux catégories suivant leur synthèse [10] :

I.2.2.1. Les colorants naturels

Ils sont très répandus, surtout dans les plantes (bois, racines, graines, fleurs et fruits) et même dans les micro-organismes et le corps des animaux. On les trouve à l'état libre ou liés à des glucides ou des protéines, exemple : garance, cochenille, indigo, pourpre. Aujourd'hui, l'importance économique des colorants organiques naturels a beaucoup diminué. Du fait de leur cherté, on ne les utilise dans l'industrie textile, du cuir et du papier que pour des traitements spéciaux. Ils restent, en revanche très utilisés dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques soumis à des réglementaires plus strictes. [11].

I.2.2.2. Les colorants synthétiques

Tous ces colorants sont synthétisés principalement à partir des produits pétroliers, notamment du benzène et de ses dérivés (toluène, naphtalène, xylène et anthracène) [11]. Ils sont de plus en plus utilisés dans les industries de coloration et des textiles grâce à leur synthèse assez facile, à leur production rapide et à la variété de leurs couleurs comparées aux colorants naturels [12]. Par la suite, ils furent désignés selon la constitution chimique du composé de base (bleu de méthylène, noir d'aniline, vert naphtalène, etc.). Actuellement, les

fabricants de matières colorantes déposent des marques protégées qui ne donnent aucune indication sur la structure, mais caractérisent la nuance et les procédés d'application. Ainsi, chaque colorant est désigné par sa couleur, sa marque commerciale et un code qui permet d'insister sur une nuance (par exemple : R = red ; Y = Yalow ou G= green; B = Blue ; 2B = more Blue, etc.) ou une qualité (L =résistant à la lumière) [13].

I.2.3. Classification selon la constitution chimique

Le classement des colorants selon leur structure chimique repose sur la nature du groupe chromophore [14] selon le (tableau I-2). Cette classification présente un intérêt pour le fabricant des matières colorantes, selon laquelle, les plus importantes sont représentées par les colorants azoïques et les colorants anthraquinoniques, les autres se résument dans les indigoïdes, les xantènes, les phtalocyanines, les nitrés et nitrosés [15].

I.2.4. Classification tinctoriale

Se révèle fort utile pour les coloristes dont le rôle est de teindre un textile particulier avec la plus grande efficacité. Au sein de chaque classe, les molécules de colorants démontrent une affinité accrue pour un type de fibres et des propriétés tinctoriales définies. Le CI a enregistré 15 classes des colorants selon le mode d'application [16, 17]. On distingue différentes catégories tinctoriales définies cette fois ci par les auxochromes [18] aussi ce type de classification permet de déterminer le type de liaison colorant-substrat[19].

I.2.4.1 Les colorants anioniques ou acides

Ce type de colorant est soluble dans l'eau à cause leur groupes sulfonâtes et carboxylates. Ces colorants sont utilisés pour teindre en bain légèrement acide les fibres animales (la soie et la laine), aussi quelques fibres acryliques modifiées (le nylon et le polyamide).

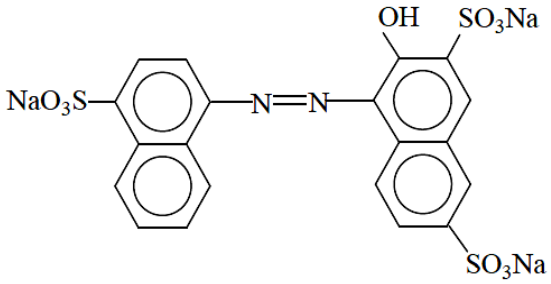
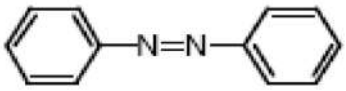
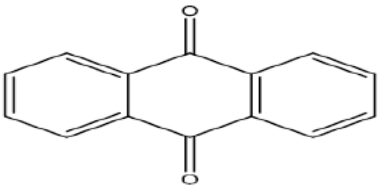
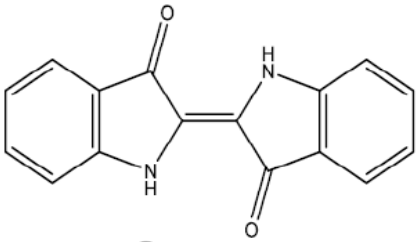
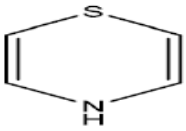
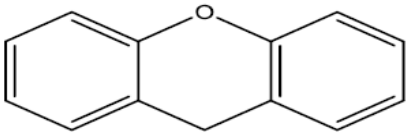
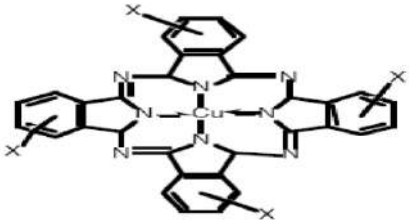
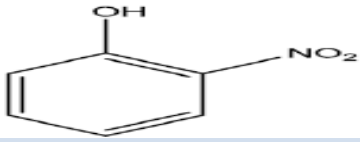
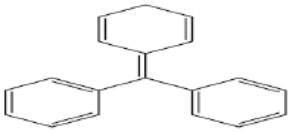


Figure I-1: Colorant C.I. Acid red 27

La liaison fibre-colorant se caractérise par la liaison ionique qui s'effectue entre la partie acide du colorant comme les sulfonâtes et les groupes amino de ces fibres1. Ce genre de colorants appartiennent aux plus grandes classes que sont les azoïques et les anthraquinoniques.[18]

Tableau I-2 les principaux class selon structure chimique repose sur la nature du groupe chromophore**.**[8]

Colorants	Structures
Azoïques : sont caractérisés par le groupe fonctionnel azo (-N=N-) unissant deux groupements (A et B) alkyles ou aryles identiques ou non (azoïque symétrique et dissymétrique).	
Anthraquinoniques : Ce sont les dérivés de 9,10 anthraquinones. L'anthraquinone constitue unc hromogène très important, qui conduit à des colorants par introduction de radicaux auxochromes OH, NH_2, NR_2.	
Indigoïdes : est un pigment extrait de l'indigotier donc c'est un colorant naturel. Il a été synthétisé pour la première fois par Adolf Von Baeyer en 1882.	
Thiazines : Composés hétérocycliques contenant un atome de soufre et un autre d'azote.	
Xanthènes : Composés hétérocycliques de formule C13H10O, dont le squelette se retrouve dans de nombreux colorants naturels et synthétiques. Ces colorants sont dotés d'une intense fluorescence.	
Phtalocyanines : Ils ont une structure complexe basée sur l'atome central de cuivre. Les colorants de ce groupe sont obtenus par réaction du dicyanobenzène en présence d'un halogénure métallique (Cu, Ni, Co, Pt, etc.).	
Nitrés et nitrosés : leur structure moléculaire caractérisée par la présence d'un groupe nitro (-NO2) en position ortho d'un groupement électrodonneur (hydroxyle ou groupes aminés).	
Triphénylméthanes : sont des dérivés du méthane pour lesquels les atomes d'hydrogène sont remplacés par des groupes phényles substitués dont au moins un est porteur d'un atome d'oxygène ou d'azote en para vis-àvis du carbone méthanique.	

I.2.4.2.Les colorants basiques ou cationique

Sont des sels d'amines organiques, ce qui leur confère une bonne solubilité dans l'eau. Les liaisons se font entre les sites cationiques des colorants et les sites anioniques des fibres..La figure I-2 donne un exemple de colorant basique. Un des colorantsles plus important de cette classe est le : Bleu de Méthylène .

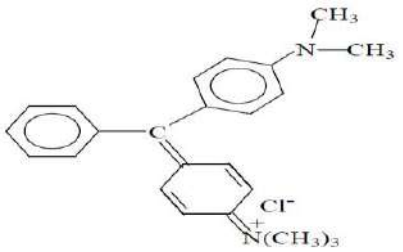


Figure I-2: Colorant CI Basic green.

I.2.4.3 Les colorants à mordant

Sont aussi dits à complexes métalliques. Ce sont des composés organiques suffisamment voisins pour former des complexes par chélation avec des sels de cobalt, de chrome (Figure I-3), de calcium, d'étain, d'aluminium ou de ferCes sels sont 34 appelés les sels à mordant Les mordants sont des produits chimiques souvent des sels métalliques ou des acides dont les fibres sont traitées avant d'être teintes. Des solides se forment lors du processus de la teinture, ce qui permet au colorant de rester fixé sur la fibre. La plupart des colorants à mordant sont azoïques ou triphénylméthanes. [20]

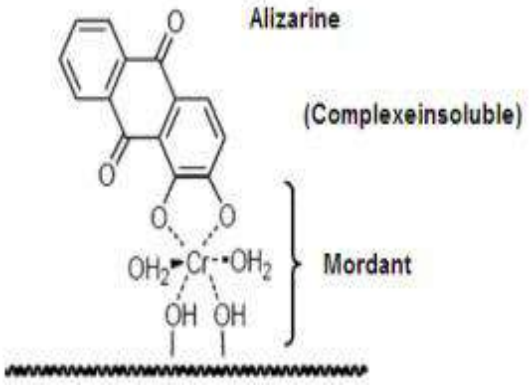


Figure I-3 : Modèle de colorant à mordant

I.2.4.4 Les colorants directs

Ces colorants contiennent ou sont capables de former des charges positives ou négatives électro-statiquement attirées par les charges des fibres. Ils se distinguent par leur affinité pour se lier à la structure plane de leurs molécules (Figure I-4)

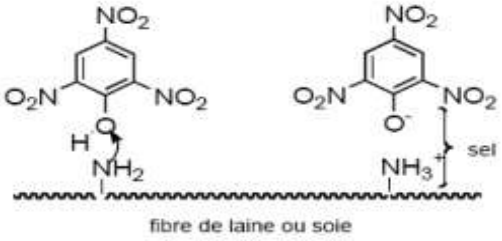


Figure I-4 : Modèle des colorants directs.

I.2.4.5. Les colorants réactifs

Ce sont des colorants dont leurs chromophores de la famille des azoïques, des mais aussi anthraquinoniques et phtalocyanines qui sont appliqués surtout pour le vert et le bleu. [16] .leur nom est lié à la présence des fonctions réactives qui forment des liaisons covalentes

très fortes avec les fibres. Cette classe de colorants est soluble dans l'eau, en plus elle est utilisée dans la teinture du coton et aussi celle de la laine et des polyamides. [19]

I.2.4.6 Les colorants de cuve

Sont insolubles et doivent être transformés en leurs codérivés par réduction alcaline. La teinture se termine par la réoxydation in situ du colorant sous sa forme insoluble initiale. Réputés pour leur bonne résistance aux agents de dégradation, les colorants de cuve sont encore utilisés, à l'image de l'indigo pour la teinture des articles jean ou denim. La figure I-5 donne un .exemple de colorant Azoïque insoluble. [22]

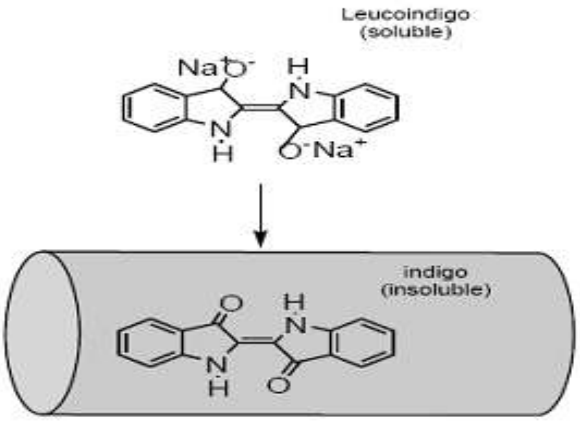


Figure I-5 : Colorant de cuve

I.2.4.7 Colorants métallifères

Ont une grande affinité pour les fibres protéiniques. Parmi les colorants métallifères, les colorants à complexes métallifères conviennent également pour les fibres polyamides. La solidité à la lumière est excellente, tandis que la solidité au lavage n'est pas aussi bonne qu'avec les colorants au chrome. [19]

I.2.4.8 Pigments

Ont la particularité d'être insolubles dans le milieu où ils sont appliqués, ce qui nécessite de faire appel à des produits auxiliaires (liants), comme certains polymères dans la peinture, pour assurer la cohésion avec le support. Sont utilisés dans les encres et les peintures. Les peintures contiennent 2 composants de base : le pigment et le liant[19].

I.3Colorant thiazine

Sont analogues aux colorants oxazines sauf que l'atome de soufre remplace l'atome d'oxygène dans l'anneau hétérocyclique [23]. Ces colorants ont un noyau phenazonium comme chromophore, avec des groupes aminés en para par rapport au soufre comme auxochrome. Ils ont un intervalle de couleur du vert au bleu et ils sont stables à la lumière [24]. Ils sont utilisés dans le domaine du textile, médecine, pharmacie et biologie [25], et employés comme antihistaminiques, tranquillisants [26], et comme des insecticides, des photo-sensibilisateurs, dans le traitement du cancer et agents antimicrobiens [27].Seulement

cinq colorants thiazines sont connus et toujours fabriqués : azure A, azure B, azure C, thionine et le plus important est **(BM)** [28, 29].

I.4 Colorant étudié

Dans ce travail, nous sommes intéressés à l'étude du colorant **BM**. Alors comme définition le **BM** se transforme en leuco méthylène incolore, due à la perte du doublet libre de l'azote et introduction d'un atome d'hydrogène [30] et C'est un dérivé de phénothiazine [31], aussi est un colorant cationique [32], il existe comme une poudre vert foncé, il existe sous plusieurs formes hydratés : monohytraté, dihydraté, trihydraté et pentahytraté [33], le plus courant c'est le trihydraté [34]. Il est couramment utilisé comme modèle de contaminant organique en raison de sa structure moléculaire stable [35].

I.4.1 Utilisation de Bleu de méthylène

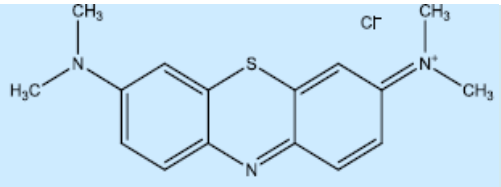
Le **MB** est utilisé intensivement dans différents domaines tel que: la chimie, la médecine, l'art dentaire et l'industrie des colorants [36]. Citant quelques usages de ce composé:

- un colorant vital, il colore certaines structures histologiques;
- il accélère la réduction des méthémoglobines.
- un antiseptique [37], un antirhumatismal [34].
- coloration du coton, bois, soie et papier [38,39].
- un limiteur optique combiné à un polymère, pour la protection des yeux contre les lasers intenses [40].
- un photosensibiliseur actif pour le traitement des tumeurs malignes [31].
- traitement spécifique d'une méthémoglobinémie toxique [41];…etc.

I.4.2 les principales caractéristiques physico-chimiques de ce colorant

Le tableau I-3 résume les principales caractéristiques physico-chimiques de ce colorant

Tableau I-3 : caractéristiques physico-chimiques de BM[19].

Propriétés	
Dénomination	Bleu de méthylène ou chlorure de tétraméthylthionine, Basic blue 9 (C.I.)
Appellation chimique	Chlorure de 3,7- bis (diméthylamino) Phénazathionium
Famille	Colorant basique
Formule brute	C16H18N3ClS
Masse molaire (mg/l)	319,85
Solubilité dans l'eau (g/l) à 20°C	40
Point de fusion (°C)	180
pH	5,9
pKa	3,8
λmax (nm)	665 ou 662
Structure	

I.4.3 Propriétés cristallines du bleu de méthylène

Une analyse avec les rayons-X du BM pentahydraté a montré qu'il s'agit d'un cristal monoclinique [19], les coordonnés de cette forme sont représentées dans le tableau I-4

Tableau I-4 : Propriétés cristallines du bleu de BM [19].

Les cordonnées de la maille élémentaire	Valeurs	Unité
A	9.646(9)	A°
B	31.106(17)	A°
C	6.992(2)	A°
B	96.70(6)	A°
U	2086.6	$A°^3$
Z	4	-

Où: **a, b et c** : Paramètres de la maile.

β: Angle du système monoclinique.

U : volume du cristal en $A°^3$.

Z : la coordinance.

I.4.4 Toxicité du bleu de méthylène

Les données toxicologiques relatives à l'utilisation du bleu de méthylène chez l'homme depuis de nombreuses années ont indiqué jusqu'à présent l'absence de danger lié à l'utilisation de ce produit comme médicament [42], dont la dose totale administré ne doit pas dépasser 7 mg/kg. Il peut causer des douleurs thoraciques, une dyspnée ; une anxiété, des tremblements, des hypertensions, et même coloration de la peau si la dose est élevée [43]. Le BM n'est pas fortement dangereux, mais il a un effet nocif sur les organismes vivants [44] et les eaux [45]. L'exposition aigue à ce produit causera :

- **Exposition externe :** irritation de la peau et des dommages permanentes aux yeux [45,46] ;
- **Par l'inhalation :** respiration rapide ou difficile [45] et augmentation de la fréquence cardiaque [47] ;
- **Par l'ingestion :** irritation de l'appareil gastro-intestinal [45], nausée, transpiration prodigue, confusions mentaux, cyanose et nécrose des tissus humains [45, 47,48].

1.5 Procédés L'adsorption

L'adsorption est un procédé de transfert de matière entre une phase liquide (ou gazeuse) chargée en composés organiques ou inorganiques et une phase solide, l'adsorbant. [49].Comme nous l'avons brièvement souligné auparavant, l'adsorption à l'interface soluté/solide est un phénomène de nature physique ou chimique par lequel des molécules présentes dans l'effluent liquide ou gazeux, se fixent à la surface d'un solide **[50]**. Ce phénomène dépend à la fois de cette interface et des propriétés physico-chimiques de l'adsorbât **[51]** . Il est aussi: spontané et provient de l'existence, à la surface du solide, de forces non compensées, qui sont de nature physique ou chimique. Ces forces conduisent respectivement à deux types d'adsorption: chimisorption et physisorption. Plus de détails sont évoqués ci-dessous:

I.5.1 Différents types d'adsorption:

I.5.1.1 L'adsorption physique (physisorption)

La physisorption ou adsorption physique est un processus caractérisé par des énergies relativement peu importantes (force de Van Der Waals) entre la matrice solide et le substrat. C'est aussi un processus réversible et aucune modification de la structure de la molécule adsorbée n'en résulte. Ce phénomène se produit se à basses températures et pour des énergies de l'ordre de 10 Kcal/mole tout au plus. Cependant Matson et Mark préfèrent utiliser le terme d'adsorption non spécifique, due aux forces de Van Der Waals entre la surface carbonée du support et le soluté [52].

I.5.1.2 L'adsorption chimique (chimisorption)

L'adsorption chimique ou chimisorption résulte de la formation d'une liaison chimique entre l'adsorbant et le substrat. Celle-ci peut être covalente ou ionique. Comparativement à l'adsorption physique, elle met en jeu des énergies d'adsorption plus élevées, qui sont de l'ordre de 100 Kcal/mole. Ce processus se produit à hautes températures, de plus, il est caractérisé par son irréversibilité. Comme pour la physisorption Matson et al **[53,54]** préfère employer le mot d'**adsorption spécifique,** qualifiant le phénomène qui résulte de la présence de groupements fonctionnels oxygénés, se trouvant sur les contours de tout le réseau cristallin. Dans ces conditions, ces derniers peuvent être à l'origine de l'interaction se produisant entre les diverses molécules organiques et la surface du matériau (charbon actif), conduisant, en fin,

à la formation de complexes. Cependant, la distinction entre les deux types d'adsorption n'est pas toujours facile. En effet, les énergies mises en jeu dans les physisorptions fortes rejoignent celles qui interviennent dans les chimisorptions faibles[53,54].

I.5.2. Le mécanisme d'adsorption d'un colorant

L'adsorption est un processus, largement répondu pour l'élimination d'un colorant a également une applicabilité large dans le traitement des eaux résiduaires [55,56]. La séparation par adsorption est basée sur une adsorption sélective (thermodynamique et /ou cinétique) des polluants (appelés adsorbat) par un adsorbant, grâce à des interactions spécifiques entre la surface du matériau et les produits adsorbés : c'est un simple transfert de masse à partir de la phase liquide vers la surface du solide, ce processus s'opère en plusieurs étapes. Diffusion externe : correspond au transfert du soluté (un colorant) du sein de la

solution à la surface externe des grains. Le transfert de la matière externe dépend des conditions hydrodynamiques de l'écoulement d'un fluide dans un lit adsorbant. Diffusion interne : les particules de fluide pénètrent à l'intérieur des pores. Elle dépend de gradient de concentration du soluté. Diffusion de la surface au contact des sites actifs, elle correspond à la fixation des molécules sur la surface des pores[56].

I.5.3 Cinétique d'adsorption

Le temps que met une substance pour ce fixé sur un adsorbant présente une importance certaine, mais son étude (la cinétique d'adsorption) ne repose pas sur les lois classiques.Il s'agit d'un transfert d'une phase liquide contenant l'adsorbant. L'étude de l'adsorption d'un composé sur un adsorbant nous permet d'examiner l'influence du temps de contact sur sa rétention**[57]**. L'adsorption peut être décomposée en quatre étapes :

- **étape n°1 :** transfert de la particule de la couche externe d'hydratation vers la couche interne.(étape très rapide).
- **étape n°2 *:*** Déplacement de l'eau liée jusqu'au contact avec le charbon.(étape rapide).
- **étape n°3 *:*** diffusion à l'intérieur du charbon sous l'influence du gradient de concentration.(étape lente).
- **étape n°4** : adsorption dans un micropore.(étape très rapide)**[57]**.

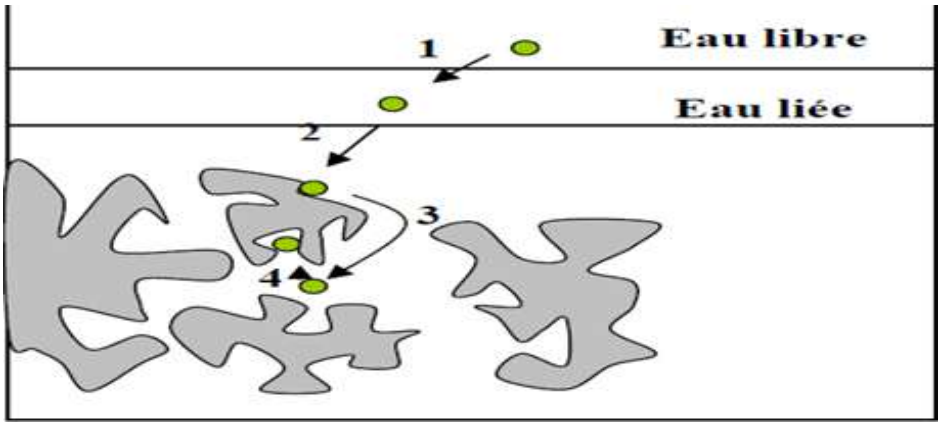


Figure I-6 : étape de transfert d'un soluté lors de son adsorption.

le niveau d'activité de l'adsorption est basé sur de la concentration de la substance dans l'eau, la température et la polarité de la subtance.une substance polaire et très mal supprimée par le charbon actif, qu'une substance non polaire peut être totalement supprime que des gaz ou des

vapeurs sur un solide. On peut cependant remarquer que : les facteurs qui peuvent augmenter la vitesse d'adsorption sont :

- la diffusion des molécules vers la surface de l'adsorbant au travers du film liquide.
- La diffusion des molécules vers surface de l'adsorbant et d'adsorption sur les sites internes. Dans la plupart des cas, la vitesse est contrôlée par le mécanisme de diffusion [58].

I.5.4 Isothermes d'adsorption

Comme leurs noms l'indiquent, les isothermes n'ont de sens qu'à une température constante. Elles ne sont pas des modèles dynamiques car elles ne dépendent pas du temps. Les isothermes communément employées sont l'isotherme de Langmuir et l'isotherme de Freundlich. Elles permettent de déterminer la capacité d'adsorption du solide pour un soute donné ; elles permettent donc de mettre en évidence si une purification est réalisable ou non. ÉgalementElles permettent d'estimer approximativement la quantité de solide nécessaire pour atteindre un rendement de traitement. Les isothermes sont des courbes mettant en relation la quantité de polluants adsorbée par unité de masse de matériau (q_e) et la concentration de polluants en solution (C_e). Les isothermes d'adsorption ont été classées par GILES en quatre principales classes : la classe **S** (Sigmoïde), la classe **L** (Langmuir), la classe **H** (Haute affinité) et la classe **C** (partition Constante)[58].

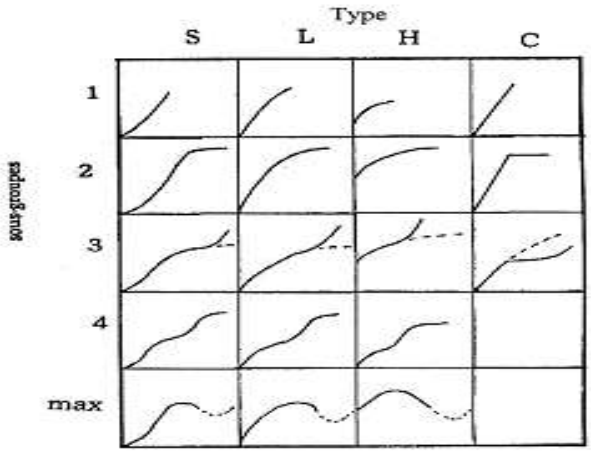


Figure I-7 : Classe d'isothermes d'adsorptio d'après GILES[47].

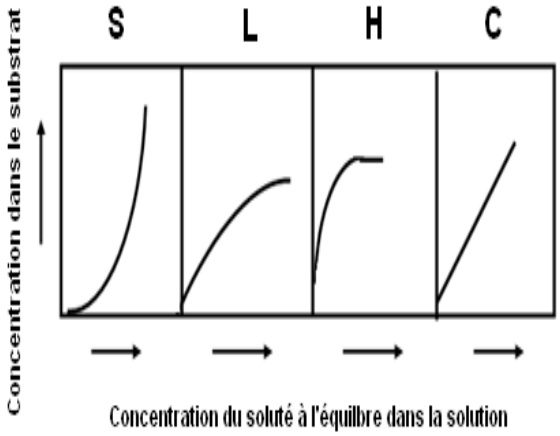


Figure I- 8: Allure des isothermes d'adsorptionselon Gilles et al [53].

- **Type C :**Les courbes sont sous formes de ligne droite avec le zéro comme origine. Elle signifie que le rapport entre la concentration résiduelle et adsorbée est le même à

n'importe quelle concentration. Ce rapport est appelé coefficient de distribution. Elles concernent les molécules flexibles pouvant pénétrer loin dans les ports pour y déplacer le solvant **[59]**.

- **Type S :** Lorsque les molécules du soluté ne s'accrochent au solide que par l'intermédiaire d'un seul groupement ; et l'adsorption du solvant est appréciable ; du fait que l'adsorption devient progressivement plus facile lorsque la quantité adsorbée croit. L'explication proposée est qu'il existe un effet de synergie coopératif ; les molécules adsorbées facilitent l'adsorption des molécules suivantes ; à cause de l'attraction latérale ce qui donne une couche adsorbée verticalement.
- **Type L** : Les courbes de type L (dites de Langmuir) sont les plus fréquentes. L'adsorption devient plus difficile lorsque le degré de recouvrement augmente. Ce comportement est rencontré dans le cas ou l'adsorption du souvent est faible ; et lorsque les molécules ne sont pas orientées verticalement ; mais plutôt à plat.
- **Type H (haute affinité)** : S'obtiennent lorsqu'il y a chimiosorption du soluté. On les rencontre également dans certains cas d'échange d'ions. L'adsorption initiale du douté dans les pores, produit vrais embalbement, une dilatation de ceux-ci, ce qui permet à d'autres molécules de pénétrer **[59]**.

I.5.5 Adsorbants

Les adsorbants sont caractérisés par leurs propriétés extérieures telles que leur surface spécifique ou leur polarité. Une importante surface spécifique est préférable pour avoir unegrande capacité d'adsorption. La taille des micropores détermine l'accessibilité des molécules adsorbables à la surface interne d'adsorption, il est donc possible de caractériser les adsorbants par la distribution de la taille des pores, et donc de choisir tel ou tel adsorbant pourune séparation particulière **[61].**

I.5.5.1 Principaux types d'adsorbants

Les principaux adsorbants employés dans l'industrie sont les charbons actifs, les zéolithes, lesgels de silices, les alumines activées dont les caractéristiques sont récapitulées dansle **tableau I-5**.

Tableau I-5: caractéristiques des principaux adsorbants industriels **[61].**

Adsorbant	Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)	Taille des pores (nm)	Porosité interne
Charbon actif	**400 - 200**	**1.0 - 4.0**	**0.4-0.8**
Zeolithes	**500-800**	**0.3-0.8**	**0.3-0.4**
Gels de silice	**600-800**	**2.0-5.0**	**0.4- 0.5**
Alumines activées	**200-400**	**1.0-6.0**	**0.3- 0.6**

I.5.5.2 Liège

Le liège est un produit naturel provenant de l'écorce du chêne liège, C'est aussi un produit abrasif qui sert à polir lecristal .Le liège est un tissu mort, spongieux, élastique et compressible qui résisteparfaitement aux incendies et préserve ainsi les couches corticales inférieures. Il est composé de couches de cellules mortes et creusesqui se forment de manière centrifuge à partir de l'assise *subérophellodermique* (la mère).Lorsque le liège n'a jamais été récolté, on parle de liègemâle liège vierge ou liège naturel. Il est dur, d'une élasticitémédiocre, profondément crevassé et de couleur grisâtre Ilest impropre à la transformation bouchonnière. L'action de récolter le liègemâle est appelée le démasclage. Le liège se régénère continuellement, larepousse après la récolte (levée) est appelée liège de reproduction ou liègefemelle (il est beaucoup plus homogène et donc propice à la fabrication debouchons) Le principal intérêt du liège est de protéger l'arbre du feu, fréquent enrégion méditerranéenne.[5]

I.6 Procédés enzymatiques

Ces procédés sont classés entre les procédés chimiques et biologiques [23, 62]. Ainsi, la variété des transformations catalysées par les enzymes a fait ces derniers une cible principale pour l'exploitation des industries biotechnologiques. Cependant, des recherches récentes ont été entrepris pour une optimisation des procédés d'isolement et de purification des enzymes menues de capacité de transformation voire de détoxification des polluants persistants et récalcitrants des effluents industriels [63]. Ainsi, les avantages du traitement enzymatique par rapport aux traitements conventionnels peuvent être résumés comme suit [25, 64-65]:

- Inhibition par les substances toxiques est très faible.

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

Les enzymes isolées catalysent la détoxication/décoloration des colorants rapidement, par rapport aux algues et aux mycètes qui prennent plusieurs jours ou même mois pour fournir les mêmes résultats [66,67]. Les enzymes oxydoréductase : peroxydases, laccases et les oxydases de polyphénol ont montré leur potentiel dans la décoloration et la transformation des polluants aromatiques tels que les phénols, les amines aromatiques, les diphényles, les diphenols et les colorants (anthraquinoniques, azoïques, nitro et nitroso) en composés insolubles moins toxiques, qui pourraient être facilement enlevé de la solution [24, 25].

I.6.1 Peroxydases

I.6.1.1 Définition

Les peroxydases sont des protéines à hème, capables de catalyser l'oxydation d'une large gamme de substrats phénoliques, en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hydroperoxyde organique comme accepteur d'électron [68].

I.6.1.2 Structure des peroxydases

Les peroxydases sont des hémoglycoprotéines. Elles sont caractérisées par la présence d'un hème central de type-b, pris en sandwich entre le domaine distal (extrémité N- terminal) et le domaine proximal (Extrémité C-terminal) de la protéine. De ce fait, l'hème constitue le groupement prosthétique de l'enzyme et la chaîne polypeptidique est. Il y a trois genres d'hème biologiquement importants (a, b et c) mais le plus commun dans les peroxydases est l'hème b. La liaison entre la protéine et l'hème n'est pas covalente et l'état d'oxydation du fer est III (Fe^{3+}). Les peroxydases ont aussi deux sites de liaison pour les ions Ca^{2+}. Le calcium est supposé stabiliser la protéine et n'intervient pas au niveau du site catalytique, même si sa présence influence fortement l'activité de l'enzyme. On sait depuis longtemps que la plupart des peroxydases sont fortement glycosylées, les résidus glucidiques peuvent représenter jusqu'à 10 % du poids de l'enzyme.L'hème et les ions calcium structuraux sont indiqués La peroxydase de raifort (HRP) est selon les bibliographies, la peroxydase la plus étudiées et qui trouve plusieurs applications [69- 70]. La structure tridimensionnelle de la peroxydase d'HRP est représentée sur la **figure I-9** [69- 70].

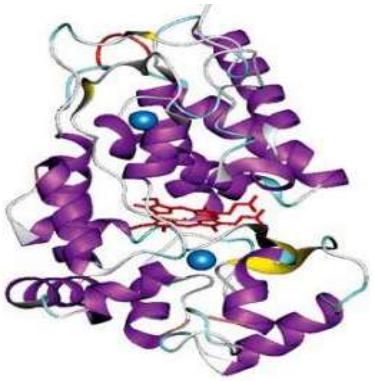


Figure I-9 : Structure tridimensionnelle IX des peroxydases [71]

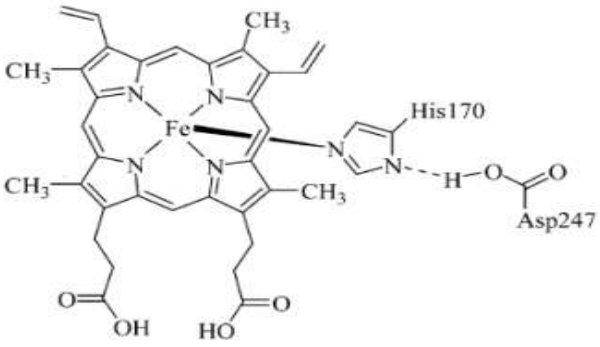


Figure I-10: Structure de Ferriprotoporphyrine de la peroxydase de HRP [71]

Le site actif des peroxydases est constitué de la partie héminique, où l'ion ferrique (fer 3+) est lié à cinq ligands : quatre avec les cycles prophyrine et un avec l'azote du noyau imidazole de l'histidine 170. La sixième liaison de coordination du fer 3+ sera engagée au cours de la catalyse par le peroxyde d'hydrogène [72, 73]. En effet, avec la peroxydase, le peroxyde d'hydrogène (comme accepteurs d'électrons) rentre dans les réactions d'oxydation des substrats (phénols, indoles, amines aromatiques, et sulfonâtes), et en fin l'oxydation des substrats aromatiques conduit en leur polymérisation.

Mécanisme réactionnel de la catalyse enzymatique Les peroxydases [donor : H_2O_2 oxydoréductase, EC. 1.11.1.7] sont des enzymes non michaéliennes L'action de ces enzymes nécessite la présence à la fois d'un composé phénolique et de l'eau oxygénée (H_2O_2). Cependant cette dernière peut être générée par les peroxydases par oxydation des acides carboxyliques. La catalyse déclenchée par l'H_2O_2 permet la formation d'enzymes transitoires (composés I, II). En réagissant avec un donneur d'hydrogène (AH), les composés I et II donnent naissance à des radicaux libres (A°) qui peuvent former des polymères en réagissant entre eux.

$$POX + H_2O_2 \xrightarrow{K_1} Composé\text{-}I + H_2O$$

$$Composé\text{-}I + AH \xrightarrow{K_2} A° + Composé\text{-}II$$

$$Composé\text{-}II + AH \xrightarrow{K_3} A° + POX + H_2O$$

$$\textbf{Bilan :}\ H_2O_2 + 2AH \longrightarrow A° + H_2O + POX$$

Figure I-11:Mécanisme de catalyse des peroxydases. AH, donneur d'hydrogène.

Ces radicaux A° subissent des réactions de polymérisation non enzymatiques pour donner des polymères insolubles dans l'eau.

nA° ----------> n/2 A-A ----------> An (Polymères insolubles)

k1 :constantes cinétiques de la formation des composés-I .

k2 : constantes cinétiques de la formation des composés-II .

k3: constantes cinétiques de la régénération de l'enzyme.

AH : un composé phénolique ;e A° son radical correspondant.

POX= peroxydase native.

Tout d'abord, un équivalent de peroxyde d'hydrogène réagit avec l'enzyme pour donner le composé I, c'est à dire un cation radical porphyrine, l'enzyme réagit avec un atome de fer tétravalent. Cela constitue une réaction d'oxydo-réduction où le H_2O_2 est réduit en H2O et l'enzyme est oxydée. Un équivalent oxydant réside sur le fer, générant l'oxyferryl ($Fe^{IV=O}$) comme intermédiaire. Le composé I oxyde le substrat pour donner le radical (AH). Il subit une seconde oxydation générant le composé II qui contient un centre oxyferryl coordonné à un ligand porphyrique normal (dianionique). Finalement, le composé II est réduit à l'état ferrique natif. La charge nette du composé I est +1 alors que celle du composé II est neutre.

En résumé, le cycle catalytique est montré sur la figure I.12 [71].

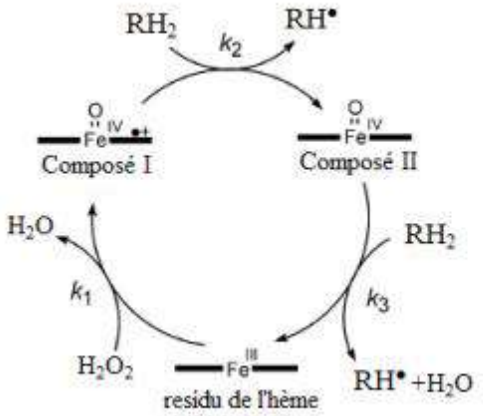


Figure I.12 : Cycle catalytique de la partie hémine de la peroxydase [71].

I.6.1.3 Classification Les peroxydases

Sont des enzymes intra ou extracellulaires, qui se secrètent par les micro organismes, les animaux et les plantes. Selon leur structure et leurs propriétés catalytiques, elles sont classées en trois familles [23] :

a) Peroxydases de classe I :

Se sont des peroxydases intracellulaires, on cite : cytochrome c peroxidase (CcP)et ascorbate peroxydase(AsP), les catalase-per-oxydases (CaP)elles sont d'origine bactérienne [26].

b) Peroxydases fongiques extracellulaires (classe II) :

Ce type de peroxydase est isolé de différents mycètes, particulièrement (WRF). La Manganèse peroxydase (MnP) et la Lignine peroxydase (LiP) sont des glycoprotéines, les plus impliquées dans la transformation des colorants synthétiques, leurs sources peuvent êtres différentes [26].

c) Peroxydases des plantes, (classe III) :

Se sont des glycoprotéines, leur chaine polypeptidique contient environ 350 acides aminés, où leur séquence varie selon la source. Le poids moléculaire de cette classe de peroxydase, est compris entres (28 à 60 kDa) se sont distribuées dans le raifort (HRP), le navet, la courgette ou BGP, les grains de Soja, la tomate, etc. Ainsi, cette classe de peroxydase est très impliquée dans le domaine de biotechnologie : en médecine, en biologie, et en chimie. Depuis plusieurs années, des études ont montrés leur capacité de décolorer et de transformer les phénols, les amines aromatiques et les colorants textiles efficacement [23, 74, 75-76,77, 78]

I.6.1.4 Applications de la peroxydase

les peroxydases reçoivent une attention particulière comme biocatalyseurs pour les applications de biosynthèse, de biotransformation et autres. La variété des réactions que catalyse la peroxydase a conduit en leur exploitation dans les applications biotechnologiques. Leurs application industrielles a fait l'objet de plusieurs études, comme l'élimination des peroxydes des rejets industriels, décoloration et traitement des composés phénoliques, des amines aromatiques et d'autres réaction de biotransformations [79]. Ainsi il a été montré leur application en biochimie clinique et comme testeurs immunologiques [28]. La plupart des colorants synthétiques ne se prêtent pas à des eaux usées par un traitement biologique conventionnel en raison de leurs structures, et le traitement des effluents

contenant des colorants implique généralement des méthodes physico-chimiques. Certains auteurs ont montré que la destruction oxydative des composés colorés est considérablement stimulé par des enzymes oxydatives, et peut-être d'un intérêt pratique pour la décoloration des colorants synthétiques.

Les enzymes des microorganismes tels que la (LiP) et le (MnP), tous deux associés à la lignine sont impliqués dans la décoloration de colorants azoïques, anthraquinoniques et phtalocyanures [80, 83 ,82], ont montré la capacité de la Mn peroxydase de dégrader la structure des colorants récalcitrants polymériques.

La LiP est utilisée pour la transformation et la minéralisation des colorants azoïques, triphénylméthane, phtalocyanures et polymériques [83]. Les autres peroxydases microbiennes telles que Dec peroxydase et versatile peroxydase sont capables de transformer quelques colorants azoïques et anthraquinoniques [84, 85].

Les peroxydases d'origine végétales sont connues par leurs capacités de transformer un large nombre de composés colorés via leur précipitation. Des études récentes sur plusieurs types de peroxydases des plantes, en particulier celles de radis et de courgette, montrent une très grande efficacité pour les colorants textiles récalcitrants avec des rendements de décoloration important. Ainsi, le traitement de quelques colorants textiles et non textiles par la peroxydase de courgette, a conduisait à leurs dégradation et leurs élimination [23, 90].

Le tableau I.3 récapitule les principales peroxydases végétales impliquées dans le traitement des colorants et effluents textiles. Transformation des composés phénoliquesLes peroxydases sont connues aussi par leur capacité de polymériser certains composés organiques récalcitrants tels que les phénols, les phénols substitués et les amines aromatiques présents dans les eaux usées des raffineries de pétrole et de nombreuses autres industries, y compris les plastiques, textiles et les industries forestières. Leur présence dans les rejets présente un risque major pour la santé publique [28, 76]. Le mécanisme de transformation peroxydasique des composés phénoliques se fait en premier lieu par la formation des radicaux phenoxy qui après leurs diffusion du site actif de la peroxydase réagissent pour former des dimères, des oligomères ou des polymères insolubles qui peuvent séparés par simple décantation [85, 79, 86], selon la réaction de la figure I.9 . La majorité des études sur la transformation des phénols et des amines aromatiques, se rapporte sur les peroxydases de raifort, de navet et de courgette (BGP) sous forme libre ou immobilisée [87, 76, 89-90].

Ainsi, un tel traitement se fait dans des conditions expérimentales douces. Par conséquent, des études de l'effet du pH, la concentration en substrat, le temps de réaction et l'effet de quelques additifs ont été étudiés, pour optimiser des états de réaction [91].

Tableau I.6: Principales applications des peroxydases végétales dans le traitement des colorants et effluents textiles.

Source de peroxydase	**Colorants/ effluents**
HRP	Noir acide 10BX ;Bleu Remazol ,Rouge Cibacron, Jaune direct 12 ; Turquoise remazol Orange II ; Orange acide 7 ;Naphtol bleu noir
Peroxydase de navet	Cinq colorants acides Colorant direct azoiques Mélange de colorants
BGP	21 colorants textiles et non textiles huit colorants réactifs Rouge disperse 17 et marron dispersé effluenttextiles ; Colorants dispersés
Peroxydase de tomate **Peroxydase de chou-fleur**	Colorants directs Effluent textile
Peroxydase de grain de soja	Colorant acide Jaune direct 11;Bleu brillant Remazol R

Synthèse des polymères Les radicaux libres produits par catalyse de la peroxydase peuvent participer aux différentes réactions post-enzymatiques. Les réactions de polymérisation par oxydation de composés aromatiques par oxydoréductases ont été étudiées pour créer de nouveaux polymères fonctionnels et de synthétiser les résines phénoliques avec une bonne sélectivité de conversion. Cela peut être réalisé sans formaldéhyde, qui doit être utilisé dans la polymérisation chimique [91]. En effet, la peroxydase de soja catalyse la polymérisation oxydative de cardanol, en utilisant du méthanol, de l'éthanol, du propanol-2, t-butylel'alcool ou de 1-4- dioxane.. D'autres réactions de polymérisation peroxydasique sont fortement favorisées par apport à la polymérisation chimique, comme la synthèse des polyanilines [91]. Biocapteurs à base de peroxydase.

Un domaine qui offre de grands potentiels pour les applications de la peroxydase comprenant les biocapteurs électrochimiques. Récemment, les électrodes à base de la peroxydase ont avait

largement utilisés dans les systèmes d'analyse pour la détermination de peroxyde d'hydrogène, les hydro-peroxydes organiques, les phénols et les amines aromatiques [91, 92]. Le principe est basé sur la notion du cycle catalytique de la peroxydase, par oxydation de deux molécules de substrats. Toutefois, dans un tel système l'électrode remplace l'électron provenant de substrat, l'enzyme immobilisé sur l'électrode est oxydé par le peroxyde d'hydrogène pour former le composé I et est réduit par l'électron provenant de l'électrode, selon la réaction (I.1) [28, 91]:

$$\text{Composé-I} + 2e^- + 2H^+ \rightarrow Fe^{3+} + H_2O \qquad \text{(I.1)}$$

Quand, le substrat est présent dans le système peroxydase-électrode, le substrat sera réduit par l'électrode :

$$R\bullet + e^- + H^+ \rightarrow RH \qquad \text{(I.2)}$$

Durant le transfert d'électrons, ces derniers agissent comme deuxième substrat pour la réaction enzymatique, résultant ainsi un changement du potentiel de l'électrode, qui se traduit par une mesure de la concentration de H_2O_2 [28, 91].

Chapitre II. Matériels et Méthodes

II.1Introduction

L'objectif de cette partie expérimentale est l'étude de dégradation d'un colorant textile, Le bleu de méthylène (BM), par la peroxydase libre avec un bioadsorbant, **le liège**, régénéré par un enzyme et quelque produit chimique. La peroxydase utilisée est extraite à partir d'une source végétale, le navet, puis purifiée en utilisant un solvant organique, l'acétone. La stratégie expérimentale de cette étude passe dans un premier temps par la mise en évidence des paramètres cinétiques de dégradation de notre colorant par la peroxydase libre, après on passe à notre objectif la régénération.

Tous les matériels nécessaires et leurs applications sont d'écrit par la suite.

II.2. Matériels et réactifs

II.2.1. Equipements

- pH mètre: DENVER instruments;
- Balance analytique:Sertorius LP620P (Précision 0.01g) ;
- Agitateur VWR; agitateur multi poste
- Etuve type UNB 400(Germany) ;
- Spectrophotomètre UV- visible de type SHIMADZU (UV mini1240) l'analyse a été faite dans des cuves en en quartz de langueur 1 cm ;
- Spectrophotomètre infrarouge
- Centrifugeuse.
- Chronomètre.
- Étuve.
- Hotte.
- Mixeur.
- Papier filtre standard (150 mm)

II.2.2 Verreries

- Les verreries classiques sont utilisées dans notre étude.

II.2.3 Réactifs

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

- Acétone, C3H6O, 100%,
- Acide citrique, C6H7O8, 99%,
- 4-Aminoantypiryne, C11H13N3O, 98%,

- Hydroxyde de potassium, KOH, 85%,
- Phénol, C6H6, 99 %,
- Le bleu de méthylène **BM** (fabriqué par Flukaanalytical) ;
- NaOH (chemlab);
- Sodium chloridec(NaCl);
- HCL.
- La poudre de liège utilisé a été fourni par la société algérienne "EPE / SPA de Jijel Etancheite's." diamètre < 0.3 mm.
- Biphthalate de potassiume()
- Chlorure de potassiume (KCl)
- Phosphate monopotassique (KH2PO4, 98%,)
- Enzyme PEROXYDASZE
- Peroxyde d'hydrogène, H2O2, 10%,

- l'eau distillée

II.3 Méthodes

II.3.1 Méthodes préparation des solutions

Pour réaliser les différentes expériences d'adsorption, on a préparé des solutions mères en colorants d'un volume de 250 mL à une concentration initiale de 100 mg/L. Les solutions fils sont préparées par la loi de dilution. La courbe d'étalonnage a été effectué par spectroscopie UV-vis avec une longueur d'onde de 664 nm qu'elle a été déterminé par balayage(voir la figure).

II.3.2 Analyse spectroscopique par UV-Visible

Le suivi d'élimination de bleu de méthylène dissous dans l'eau a été analysé par UV visible avec un langueur d'onde d'absorption maximale de 664 nm qui a été déterminé expérimentalement.

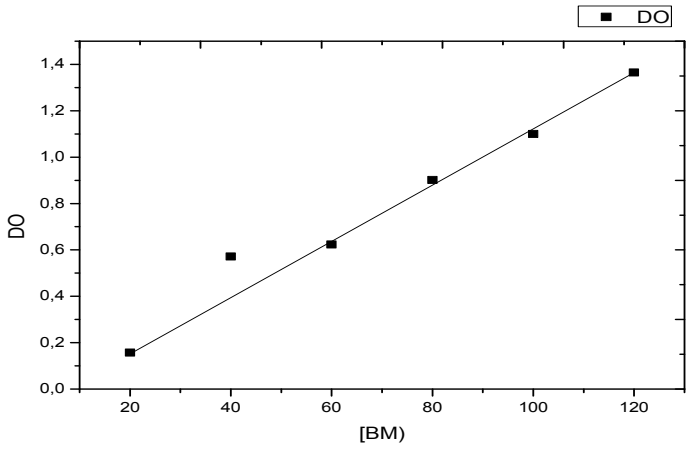


Figure II.1 : Courbe d'étalonnage **du BM**

II.3.3 Préparation des solutions tampons

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

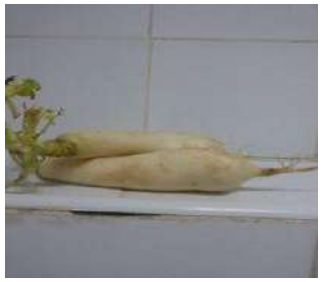
- Solution tampon pH 02 préparé par chlorure de potassium (0.01 M)
- Solution tampon pH 03 ; 4.0 ; et 5.0 préparé par biphtalate de potassium (0.01 M).
- Solution tampon pH 6.0 ; 7,0 préparée par phosphate mono-potassique (0,01M).
- Solution tampon pH 8.0 ; 9.0 ; 10 préparé par chlorure de potassium (0.01 M) et acide bourique (0.01 M).

En ajustant les solutions en utilisant la solution de KOH (0,2N) et HCl (0,2 N),pour des déférentes valeurs de pH étudiées .Le pH de solution a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

II.3.4. Méthode d'extraction et purification de peroxydase de navet blanc

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

- Mettre 500 g de navet dans un mixeur après l'avoir éplucher avec 1000 ml 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 500 mL de l'extrait brut et un bécher contenant 500 mL de l'acétone au congélateur. Préparer de la glace pilée dans un cristallisoir.
- Après 15min au congélateur, faire sortir l'extrait brut et le disposer sous 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 (4°C) pendant 2 heures ; il se forme un précipité pour le récupérer, centrifuger à 3000 rpm pendant 15min.
- Dissoudre le culot dans 5 ml de tampon pH=7, la solution obtenue est de l'extrait enzymatique partiellement purifiée (EEPP).
- Répartir la solution en aliquotes dans des tubes à hémolyse et les placer au congélateur (4C°).



1-Prendre 500 g de navet après avoir les éplucher



2-Le navet pesé et coupé en petits morceaux.



3-Broyage des morceaux du navet dans un mixeur avec 1000 ml d'eau distillé.



4-Filtration de mélange obtenu avec une gaze.



5-obtention d'un (EBB) conservé à basse température



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



7-Après 2heurs dans le réfrigérateur : Il se forme un précipité.



8-Centrifugation du mélange



9-Dissolution de culot dans 5ml de tampon pH 7.0 : (EEPP).

Figure II.2 : préparation de l'extrait enzymatique de la peroxydase de navet blanc

II.3.5 Teste de l'activité enzymatique

Les peroxydases catalysent l'oxydation de nombreux substrats aux dépens de H2O2 selon l'équation totale :

2 H2O2 + phénol+ 4-Aminoantipyrine → Quinoneimine + 4H2O *(Eq.II.1)*

La réaction s'effectue entre un substrat (phénol), sous substrat H2O2 et 4-AAP qui joue le rôle d'un chromogène. Le changement de la couleur au cours de la réaction (Eq II.1) est converti à l'activité enzymatique de la biodégradation du peroxyde d'hydrogène par l'enzyme. 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°.**[11]**

II.3.6 Méthode du dosage

- Dans une fiole de 50 ml introduire :
  - 1 ml de phénol, 0.1M ;
  - 1 ml de H2O2, 0.1M ;
  - 1 ml de 4-aminoantipiryne (0.01M).
- Compléter le volume jusqu'à trait jauger par une solution tampon pH=7 (phosphate
- monopotassique, 0.01M).
- Placer 4 ml de mélange précédemment dans un tube à essai.
- Ajouter 0.2 ml de l'EEPP ou de l'EEB, agiter par retournement entre le pouce et l'index.
- Placer rapidement le mélange réactionnel dans la cuve de spectrophotométrie.
- Lancer la cinétique par mesure de la densité optique avec un pas de 10 seconds.
- On mesure l'activité enzymatique de la peroxydase par la consommation de peroxyde d'hydrogène à 517 nm. Le zero d'absorbance est obtenu à l'aide du blanc qui est le tampon phosphate à PH=7 .
- Tracer l'allure DO = f (temps) qui a la pente égal à ΔDO/Δ t
- La formule pour calculer l'activité enzymatique est :

.

$$AE(UI/ml) = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \times \frac{Vr}{Ve} \times \frac{1000}{7425} \times \text{facteur de dilution} \qquad \text{(Eq II.2)}$$

Avec :

Ve : Volume de l'extrait enzymatique, 0.2ml

Vr : Volume réactionnel, 4.2ml

t : temps (min)

II.3.7 Modification chimique du liège

Tout d'abord prendre 20g de poudre du liège dans 100 ml du tensioactif SDS (2.9 g/l = 0.01 mol / l). Ensuit chauffer ce mélange à $50c^0$ sous l'agitation pendant 4h et après on fait un filtration du ce mélange avec un papier filtre. on le séché à 60 C^0 pendant 24 h . à la fin de cette opération on range le support dans le dessiccateur.

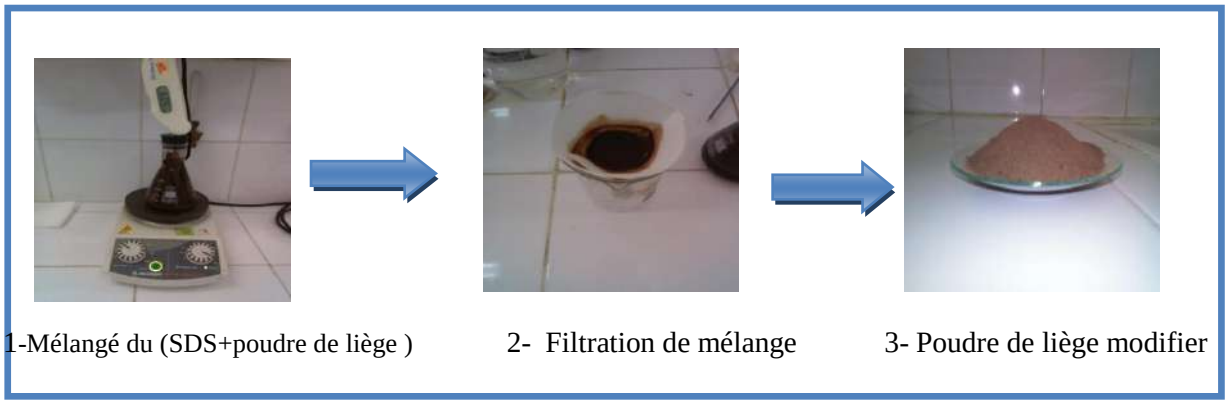


Figure II.3 Modification chimique de liège

II.3.8 le PH du point de charge zéro (pH_{PZE})

Le point de charge zéro à été utilise pour déterminer le point ou la densité de la charge électrique est nul. la méthode de Balistrieri and Murray à été utilisée pour déterminer le point de charge zéro de l'adsorbant une masse de 0.15 g de l'adsorbant à été introduit dans une solution aqueuse de Nacl 50 ml à 0.01 N et le PH a été ajuste à des valeurs initiales successives entre 2 et 10 . les suspensions ont été agitées durant 48 h et de la courbe (pH_i – pH_f) est le point de charge zéro de la surface de l'adsorbant



Figure II.4 pH du point de charge zéro

II.3.9 Effet des paramètres opératoires sur la biodégradation du BM par la peroxydase libre

II.3.9.1 Effet du pH :

Les expériences ont été réalisées pour un mélange réactionnel en utilisant des solutions tampons de pH variant de 2 à 10 à température ambiante pendent 1h. Effet du pH sur BM par la peroxydase du navet est étudié selon la procédure suivante :

- Prendre 8 tubes à essai, dans chacun introduire 2.8 ml de pH varient de 2 - 10.
- 1 ml de H_2O_2 à concentration de 5mM.
- 1 mL de BM d'une concentration 500 mg L^{-1} .
- 0.2 ml d'EEPP comporte un AE= 6.78 U ml^{-1}.

Apres 2h de réaction, on mesurer les DO finales des notre solution à λ_{max}= 640 nm.

II.3.9.2 Effet de la concentration du H_2O_2

La même expérience est répétée dans les conditions optimales de pH, température et concentration en colorant pour une variation de H_2O_2 entre: 2.5 et 75 mM .

Remarque : La même expérience est répétée pour l'AE = 9

Apres on calcule le rendement d'adsorption(%) :

$$R = \frac{DOi - DOf}{DOi} \times 100 \qquad \text{(Eq II.3)}$$

II.3.10 Régénération enzymatique de l'adsorbant

Des expériences de l'adsorption et de désorption ont été menées en utilisant le peroxydase du navet partiellement purifié . le régénération à été effectué avec une activité enzymatique 6.87 Unités ml^{-1}. Tous expériences ont été réalisé dans les conditions optimales.



Préparation des milieux réactionnels



Filtration des milieux



Lavage de milieux avec des solutions chimique



le séché à 60 C^0 pendant 30-45 min

Figure II.5. Séparation de l'adsorbat-adsorbant



Figure II.6 observation finale de lavage et le filtration

Chapitre III.RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1 Introduction

L'objectif de cette partie expérimental est l'étude de dégradation d'un colorant le bleu de méthylène par la peroxydase libre. La stratégie expérimentale de cette étude passe dans un premier temps par optimisation des quelques paramètres opératoires sur la dégradation de notre colorant par la peroxydase libre on a fait des expériences sur le colorant BM tels que : l'effet de pH, de H_2O_2 sur la dégradation de colorant BM donc chaque expérience donne une valeur optimal de la dégradation. L'intérêt de faire une optimisation c'est l'amélioration de rendement de dégradation de colorant. Aussi étude passe sur la régénération (réutilisation) de l'enzyme pour la dégradation du colorant (BM) dans les conditions opératoires optimales avec des solutions chimiques et par l'enzyme.

III.2 Calcul de l'activité enzymatique

L'avancement de la réaction est déterminé par la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 664 nm, qui indique l'évolution d'une couleur rose résultant de la décomposition du H_2O_2 et transformation du phénol en Quinoneimine. Les valeurs des vitesses initiales ainsi obtenus sont la pente ΔDO/min.

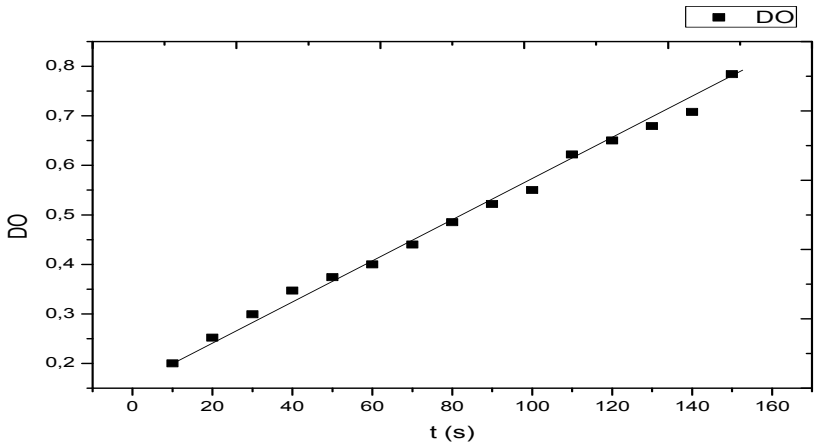


Figure III.1 : activité enzymatique pour l'extrait EEPP1

Donc

$$AE1 = 0.004 \times 60 \times \left(\frac{4.2}{0.2}\right) \times \left(\frac{1000}{7425}\right) \times 10$$

$$AE1 = 6.78\ UI/ml$$

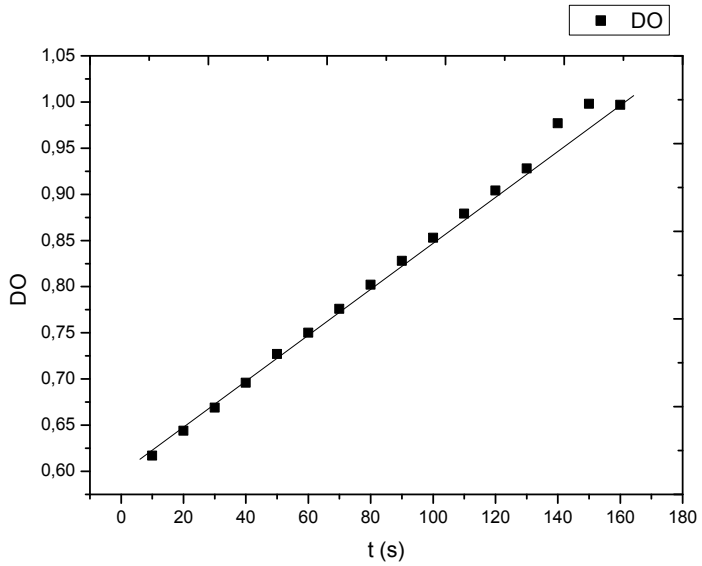


Figure III.2 : activité enzymatique pour l'extrait EEPP2

Donc :

$$\boldsymbol{AE2 = \frac{(0.0026 * 60 * 4.2 * 1000 * 4)}{0.2 * 7425 * 0.2} = 8.82 UI/ml}$$

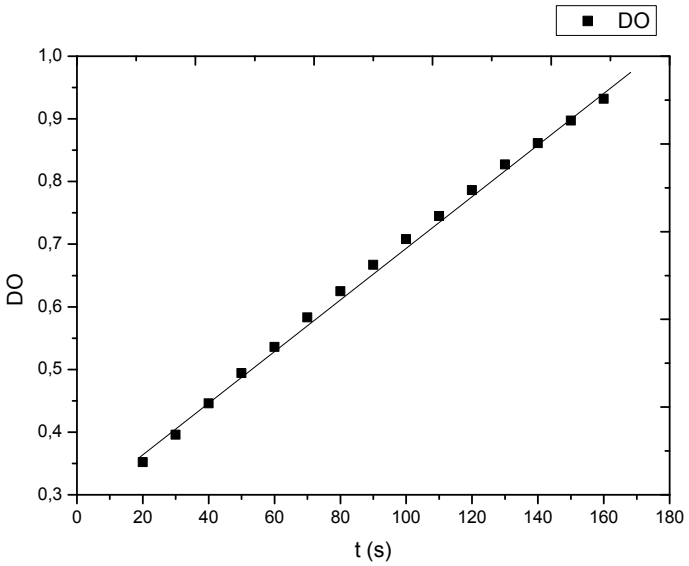


Figure III.3 : activité enzymatique pour l'extrait EEPP3

$$\boldsymbol{AE3 = \frac{(0.0042 * 60 * 4.2 * 1000 * 4)}{0.2 * 7425 * 0.2} = 14.25 UI/ml}$$

III.3 pH de point de charge 0

Pour élucider le rôle de la charge nette portée par la surface de l'adsorbant dans la fixation du colorant, nous avons procédé à la détermination du point de charge zéro ou pH_{PZC} . Celui-ci correspond à la valeur de pH du milieu pour Laquelle la résultante des charges positives et négatives (charge nette) de la surface est nulle. Le pH_{PZC} est très important dans les phénomènes d'adsorption, surtout lorsque les forces électrostatiques sont impliquées dans les mécanismes, ce qui est le cas avec les biomasses. Ainsi, pour déterminer le pH_{PZC}, des essais de pH ont été réalisés par une méthode simple et rapide.

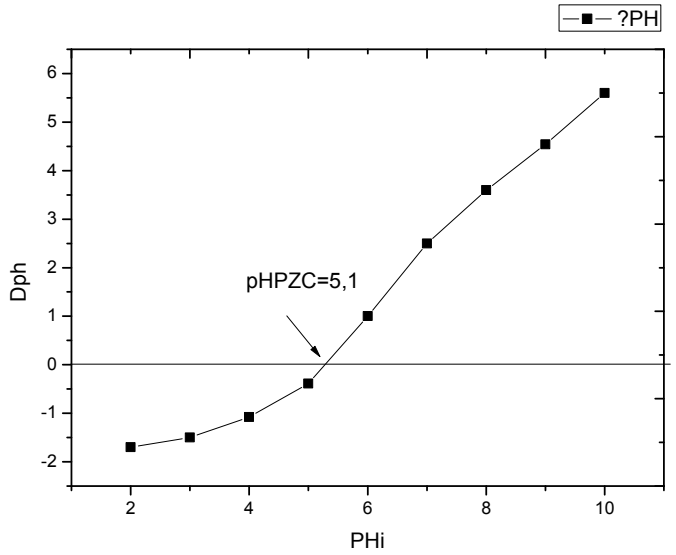


Figure III.3 Le point charge zéro (pH_{PZC}) de liège modifié

Le pH_{PZC} est le point où la courbe ΔpH_{final} vs. $pH_{initial}$ intercepte la ligne ΔpH_{final} =0 avec la courbe. La figure 3 montre que le pH_{PZC} de liège modifié chimiquement est égal à 5.1. La charge globale de la surface est positive pour les solutions de pH inférieur à cette valeur et elle est négative lorsque les pH_s sont supérieurs au pH_{PZC}. Comme le colorant utilisé est basique, sa dissolution dans l'eau fait libérer des ions colorés de charge positive (cations).

La bleu de méthylène contient des groupements polaires tels que les hydroxyles et les carboxyles. Aussi, la charge électrique du bioadsorbant dépend du pH du milieu, du fait de l'ionisation de ces groupements fonctionnels de surface. a remarqué que la rétention du bleu méthylène sur un bioadsorbant augmente avec l'augmentation de la charge négative de la surface.

III.4 Effet du pH sur l'élimination du colorant

L'influence du pH initial des solutions sur la catalyse du BM par la peroxydas a été étudiée dans l'intervalle de pH=3 à pH=10. Les quantités de colorant élimines à partir de différentes solutions ont été trouvées en relation étroite avec la valeur du pH initial de la solution (Figure III.5).

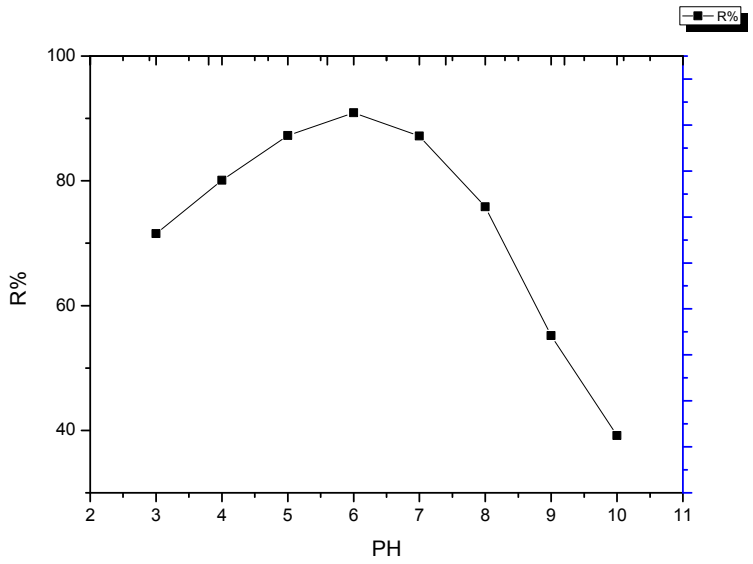


Figure III.5 Effet de pH du bleu de méthylène par la peroxydase.V= 0.2 ml d'EEPP comporte un AE= 6.78 U ml^{-1} ; Concentration [BM] = 500 mg L^{-1} ;V(BM)=1 ml ;1 mL de H2O2 d'une concentration 5 mM ; Temps(T)= 120 min ; Température (T)= 298 °K. 2.8 mL de solution tampon de pH=3, 4,5,6,7,8,9,10

Toute enzyme catalyse une réaction dans un intervalle de pH optimal dans lequel son activité est maximal par ailleurs, la dépendance au pH pour donner une indication quant au groupement impliqué dans le mécanisme réactionnel par exemple la protonation et la déprotonation d'un groupement à l'état actif ce qui peut conduire à une perte de son activité. L'influence du pH initial des solutions sur la catalyse du BM par la peroxydas a été étudiée dans l'intervalle de pH=3 à pH=10. Les quantités de colorant élimines à partir de différentes solutions ont été trouvées en relation étroite avec la valeur du pH initial de la solution (Figure III.5). Les taux de rétention sont appréciables entre les valeurs de pH comprises entre 5et 9, avec un pic de rétention vers pH6, puis une diminution d'efficacité est observée avec l'augmentation du pH jusqu'à pH9; le taux diminue de ~90.91 à ~39 % entre ces deux valeurs. Au-delà de pH7, une diminution de l'efficacité a été observée.

Donc le pH 6 est le pH optimal qui donne une décoloration maximale de BM avec d'enzymes libre avec un rendement =90.91

III.5 Effet du $[H2O2]_0$

L'influence du H_2O_2 initial des solutions sur la catalyse du BM par la peroxydas a été étudiée dans l'intervalle de $[H_2O_2]$=(2.5-75)mM . Les quantités de colorant élimines à partir de différentes solutions ont été trouvées en relation étroite avec la valeur du $[H_2O_2]$ initial de la solution (Figure II.6). Les taux de rétention sont appréciables entre les valeurs de $[H_2O_2]$ comprises entre 5 et 75 mM , avec un pic de rétention vers $[H_2O_2]$ = 10 mM, puis une légère diminution d'efficacité est observée avec l'augmentation du $[H_2O_2]$ jusqu'à $[H_2O_2]$=75 mM; le taux diminue de ~89 à ~9 % entre ces deux valeurs. une diminution de l'efficacité a été observée

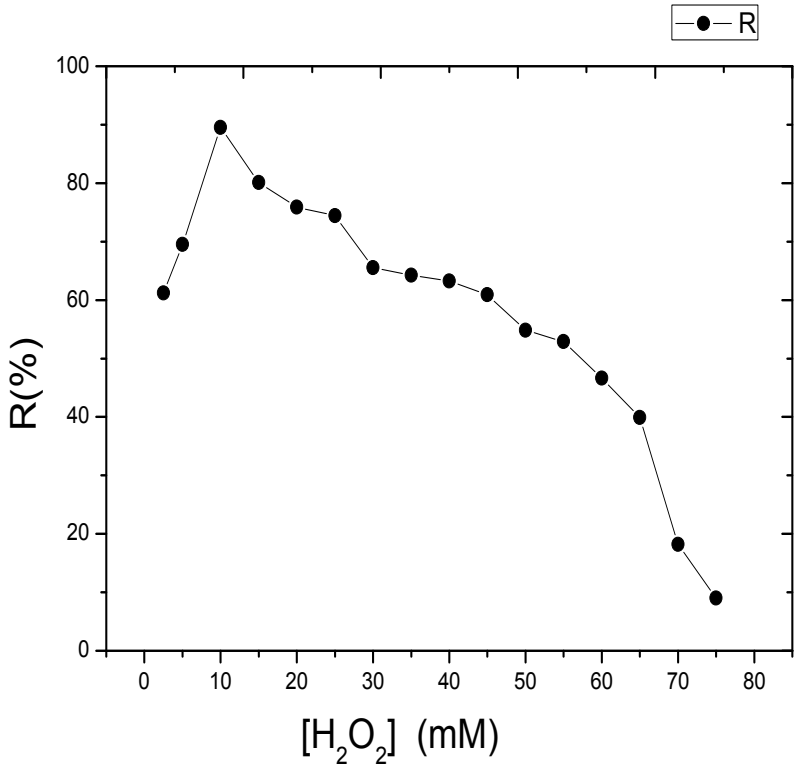


Figure III.6 :Effet de[H2O2] sur bleu de méthylène par la peroxydase.V= 0.2 ml d'EEPP comporte un AE= 6.78 U ml^{-1} ; Concentration[BM] = 500 mg L^{-1} ;V(BM)=1 ml ; Temps(T)= 120 min; ; Température (T)= 298 °K. 2.8 mL de solution tampon de pH=6

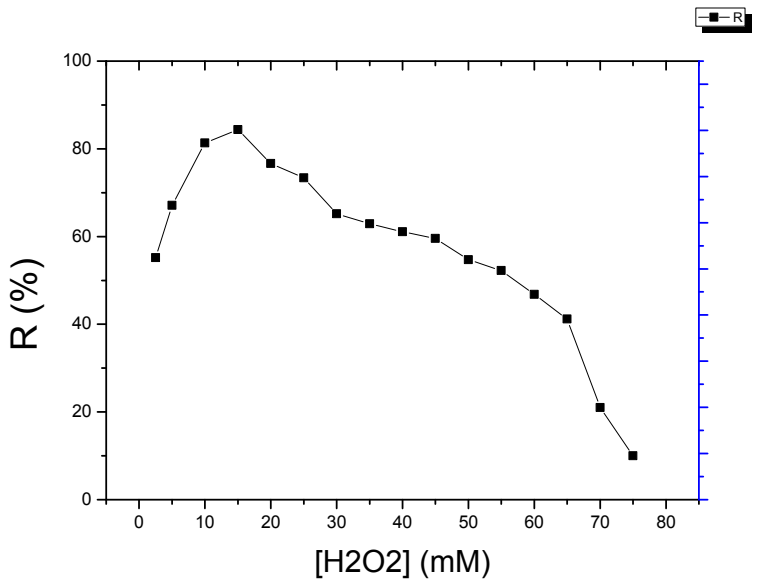


Figure III.7 :Effet de[H2O2] sur bleu de méthylène par la peroxydase.V= 0.2 ml d'EEPP comporte un AE= 9 U ml^{-1}; Concentration[BM] = 500 mg L^{-1};V(BM)=1 ml ; Temps(T)= 120 min; ; Température (T)= 298 °K. 2.8 mL de solution tampon de pH=6

L'influence du H_2O_2 initial des solutions sur la catalyse du BM par la peroxydas a été étudiée dans l'intervalle de [H_2O_2]= (2.5-75)mM . Les quantités de colorant élimines à partir de différentes solutions ont été trouvées en relation étroite avec la valeur du H_2O_2 initial de la solution (Figure II.7). Les taux de rétention sont appréciables entre les valeurs de [H_2O_2]comprises entre 5 et 75 mM , avec un pic de rétention vers [H_2O_2]= 15 mM, puis une légère diminution d'efficacité est observée avec l'augmentation du H_2O_2 jusqu'à [H_2O_2]=75mM; le taux diminue de ~84.63 à ~10 % entre ces deux valeurs. une diminution de l'efficacité a été observée

III.6 Régénération enzymatique de l'adsorbant

Des expériences de l'adsorption et de désorption ont été menées en utilisant un type de régénération : l'enzyme partiellement purifié. Le dernier type de régénération a été effectué avec une activité enzymatique=6.87 UI/ml. Toutes expériences ont été réalisé dans les conditions optimales (voir la figure III.8).

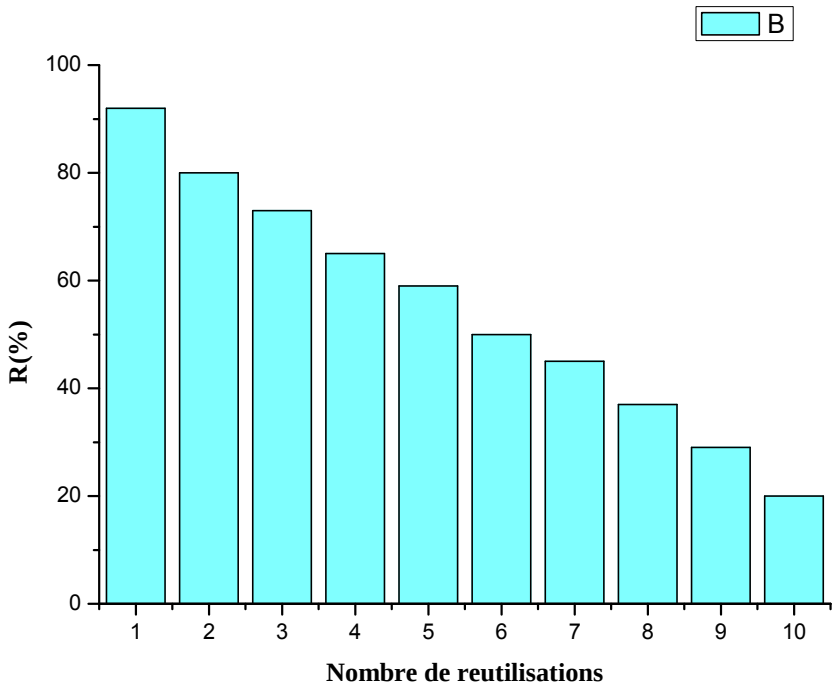


Figure III.8 Réutilisation de liège modifié lors d'adsorption de BM avec l'enzyme. T=35 °C, , pH=7, [Colorant]=100 mg/L, m=0.04 g, temps =**2 h**.

D'après la figure, l'enzyme présente un mode de régénération la plus efficace ou le nombre de réutilisation a été atteint 10 ième fois pour une activité enzymatique 6.87 unités/mL.

III.7 Conclusion

Les résultats obtenus montrent que l'enzyme peroxydase extraite à partir du navet blanc, sous forme d'enzyme libre, permet de décolorer efficacement le BM sous des conditions physicochimiques récapitulés .

Conclusion générale

Conclusion générale

Nous avons traité un colorant le BM par un procédé classique est l'adsorption et enzymatique qui met en œuvre la peroxydase extraite à partir d'une culture locale de navet blanc, La peroxydase était obtenue à partir d'une source peu coûteuse et très disponible, sa purification par l'acétone permet d'obtenir un extrait enzymatique partiellement purifié. La purification de la peroxydase a été effectuée par la précipitation à l'acétone, une méthode simple et efficace qui nous a donné un rendement de purification de 90 %.

Les résultats des essais d'optimisation ont permit d'un coté de déterminer les conditions physicochimiques de pH et de [H_2O_2] sous les quelles on obtient une décoloration maximale. On a conclue que la peroxydase du navet est une enzyme moyennement stable.

La désorption de liège modifié a été effectuée par l'enzyme partiellement purifié (Peroxydase de navet blanc) pour une activité enzymatique 6.87 UI mL-1 ; ou le rendement et la quantité d'adsorption a été quasi stable pendant 10 réutilisation.

Enfin, une application relevant du domaine environnemental a été réalisée. Il s'agit de l'élimination ou de la décoloration d'un colorant (bleu de méthylène) par un traitement mettant en jeu la peroxydase de navet comme catalyseur couplé avec une adsorption par le lège modifier, en présence de peroxyde d'hydrogène.

Références bibliographiques

[1]: Batzias F.A. et D.K. Sidiras: Dye adsorption by prehydrolysed beech sawdust inbatch and fixed-bed systems. *Bioresour.Technol.*, **(2007)**. , 98, 1208-1217.

[2]: Juang R.S, F.C. Wu et R.L. Ts eng: The ability of activated clay for theadsorption of dyes from aqueous solutions. **(1997)**. *Environ. Technol*., 18, 525-531.

[3]: Robinson T., G. McMull an, R. March ant et P. Nigam: Remediation of dyes intextile effluent: 388 *Adsorption du bleu de méthylène*a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour.Technol*. **(2001)**, 77, 247-255

[4]: Roulia M. e, A.A. Vass iliadis (2005). Interactions between C.I. Basic Blue 41 andaluminosilicatesorbents.*J. ColloidInterf.Sci*., 291, 37-44

[5] :Djeddou.A ,Barki.W : mémoire de master « étude de l᾽adsorption d᾽un colorant par le liège modifie par voie chimique avec régénération enzymatique de l᾽adsorbant » , université yahiafares-pole universitaire, 2015-2016.1

[6]: Capon.M.,Courille. V, Valette .C : chimie des couleurs et des odeurs .Nantes ,Cultur et technique(1999).

[7]: Sandhya.S: Biodegradation of Azo Dyes Under Anaerobic Condition: Role of Azoreductase, Biodegradation of Azo Dyes, The Handbook of Environmental Chemistry, Springer Verlag Berlin Heidelberg 9 (2010) 39-57.

[8]: Chawki.D : « Experimentation, modelisation et optimisation de l'adsorption des effluents textiles », thèse doctorat en sciences en chimie industrielle,universitemohamedkhider de biskra, (10/04/2014), 19.

[9]:Feng.F.,Xu.Z.,Li X You W.,and Zhen .Y: Advanced treatment of dyeing wasterwater towards reuse by the combined Fenton oxidation and membrane bioreactor process Journal of Envirenmentale Sciences22 (2010) pp 1657-1665.

[10]: Dore.M : Chimie des oxydants et traitement des eaux. Edition Paris1989.

[11]: Simont.G : Guide des techniques de l'ennoblissement textile. Chapiter 11, éditionindustries textile. (1982).

[12]:Griffiths.J: Developments in the light absorption properties of dyes–color and photochemical reaction. Societyof Chemistry Industry, Oxford, pp 1-30 (1984).

[13]:Zollinger.H: Color Chemistry – syntheses, proprieties and applications of organic dyes and pigments. VCH Publications, New York, N.Y (1991)

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

[15]:Hitz.H R, Huber .W; Reed .R .H:the absorption of dyes on activated sludge. Soc J Dyerscolorists, (1978) 71-76.

[16]:Ouldterki.A ,Benrached.H :mémoire de fin d'études master en génie des procède ,Degradastion des colorant azoitiques dans un bioréacteur enzymatique a peroxydase immobilisee .2016.p11

[17]: Pagga.U, Taeger.K: development of a method for adsorption of dyestuff on activated sludge.Water. Res. , (1994) 1051-1057.

[18]:Vinod.V.P ,Anirudhan.T.S: Adsorption behavior of basic dyes on the humic acid immobilized pillared clay, Water, air, Soil. Pollut. (2003) 193-217.

[19]:Gulkaya.I.,Surucu.G.A., Dilek.F.B: Importance of H_2O_2/ Fe2+ ratio in Fenton's treatment of a carpet dyeing wastewater. *J. HazardousMaterials*, 136, 763-769, 2006.

[20]:Saidi F.Z : mémoire de magister en chimie « elimination du bleu de méthylène par des procédés d'oxydation avancée». Universitéaboubakrbelkaid – tlemcen,p 6.-10-11

[21]:Satake.M, Mido.Y: Chemistry Of Colour cationic and related dyes, Discovery Publishing House, INDIA, 1er Edition (1995).

[22]: Belaroui .L.S : Thèse Doctorat, « Préparation et Caractérisation des Argiles à Piliers Mixtes Al-Fe et leurs applications comme catalyseurs dans la réaction d'oxydation de Baeyer Villiger et extension a d'autre catalyseurs à base de fer », 2008, Université.

[23]:Husain.Q, Husain.M: Peroxidases as a Potential Tool for the Decolorization and Removal of Synthetic Dyes from Polluted Water, chapter 15, Environmental Protection strategies for Sustainable Development, Strategies for Sustainability, Springer Science Business Media B.V. (20.012) 453-498.

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

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

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

[27]:Nouren.S: Decolorization of synthetic dyes by Citrus peroxidase, Thèse de Doctorat, University of Agriculture Faisalabad, Pakistan 2014.

[28]:Hamid.M,Rehman.K: Potential applications of peroxidases, Review, Food Chemistry, 115(2009)1177– 1186.

[29]:Hailei.W ,Ping.L, Min.P, Zhijun.Z , Guangli.Y , Guosheng.L, Jianming.Y: Rapid decolourization of azo dyes by a new isolated higher manganese peroxidase producer: Phanerochaete sp. HSD, Biochemical Engineering Journal, 46(2009)327–333.

[30]:Wilson.T.M: On the chemistry and staining properties of certain derivatives of the methylene blue group when combined with eosin. American Journal of Physiology 19 (1907) 647-670.

[31]:Bolotin.P.A,Baranovsky.S.F, M.P. Evstigneev.M.P: Spectrophotometric investigation of the hetero-association of Caffeine and thiazine dye in aqueous solution. SpectrochimicaActa Part A 64 (2006) 693–697.

[32]:Cenens.J, Schoonheydt.R.A: Visible spectroscopy of methylene blue on hectorite, laponite b, and barasym in aqueous suspension. Clays and Clay Minerals 36 (1988) 214-224.

[33]:Rager.T,Geoffroy.A, Hilfikera.R, John .M. D. Storeyb: The crystalline state of methylene blue: a zoo of hydrates. Phys. Chem. Chem. Phys.14 (2012) 8074–8082.

[34]:Beer.R, Baumann.M ,Kielbassa.A: Pocket Atlas of Endodontic: staining the cavity with methylene blue. Thieme (2006)

[35]:Huang.F, Chen.L, Wang.H, Yan.Z: Analysis of the degradation mechanism of méthyléne blue by atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. Chemical Engineering Journal 162 (2010) 250–256.

[36]: P. F. Gordon.P.F: et al Organic Chemistry in Colour: Classification and Synthesis of Dyes; Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1987)

[37]:Dutta.K, Mukhopadhyaya.S, Bhattacharjee.S, Chaudhuri.B: Chemical oxidation of methylene blue using a Fenton-like reaction. Journal of Hazardous Materials B 84 (2001) 57–71.

[38]:Mohd. Rafatullaha, Sulaimana.O, Hashima.R, Ahmad.A: Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: A review; Journal of Hazardous Materials 177 (2010) 70–80.

[39]:Uddin.Md.T, A.Islam.Md, Mahmud.S, Rukanuzzaman.Md: Adsorptive removal of methylene blue by tea waste. Journal of Hazardous Materials 164 (2009) 53–60.

[40]:Sukumaran.V.S, Ramalingam.A: Third order optical nonlinearities and spectral characteristics of methylene blue. Journal of Quantum Information Science 1 (2011) 69-72.

[41] :Barriot.P,Danel.V : Intoxications aigues en réanimation; Groupe liaisons S.A. 2ème édition (1999).

[42]: Freeman .H.S , Mock .G.N , : Application.Dye,Manufacture of Dye Intermediates and Dyes, Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology, Springer Science Business Media New York (2012)475-548.

[43]:Manahan.S.E: Environmental chemistry, Lewis publisher florida U.S.A 6th Edition,., 1994.

[44]:Hunger.K, Industrial .Dyes: Chemistry, Properties, Applications, Edition Dr. Klaus Hunger, Frankfurt, Germany (2003).

[**45]:Zollinger.H:** Color Chemistry. Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments, 2nd rev Ed, VCH, weinheim,1991.

[46]:Shirsath.S.R ,Patil.A.P , Patil.R , Naik.J.B , Gogate.P.R. Sonawane.S.H. Removal of Brilliant Green from wastewater using conventional and ultrasonically prepared poly (acrylic acid) hydrogel loaded with kaolin clay: A comparative study. UltrasonicsSonochemistry 20 (2013) 914–923. doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.11.010. Epub 2012 Nov 28.

[47]: Servais .P : La matière organique dans les milieux naturels. Presse de l'Ecole Nationale des Ponts et Chausses, octobre 1999, p. 49

[48]:Tavlieva.M.P,Genieva.S.D ,Georgieva.V.G, Vlaev.L.T: Kinetic study of brilliant green adsorption from aqueous solution onto white rice husk ash . Journal of Colloid and Interface Science 409 (2013) 112–122.

[49]:Dincer.A.R, Guner.Y, Karakaya.N: Coal-based botton ash (CBBA) waste material as adsorbent for removal of textile dyestuffs from aqueous solution, Colloid and interface science 293 (2006) 303-311

[50]:James .M. Montgomery, Consulting Engineers, Inc.: water traitementprincipales and designs. New York :s.n. ; 1985.

[51]: Weber .W.J.JR ;MeGinley .P.M et Katz.L.E.katz :sorption phenomena in subsurface systems: concept, models and effect on contaminant fate and transport, water Res. 1991. Pp. 499-528.

[52]: Matson .J.S et Mark .H.B: Activated carbon. Surface chemistry and adsorption form solution. New york : Marcel Dekker ; 1971.

[53]:Delaat .J : contribution à l'étude du mode de ll'élimination de molécules organiques modéles sur le charbon actif en grain. Interaction entre les processus d'adsorption et de biodégradation. Université de poitiers. 1988. Thése de doctorat de 3éme cycle

[54]:Matson .J.S ,Mark .H.B : Malbinetal.surface chemistry of active carbon :specific adsorption of phenol .J. Colloid Interface science. 1969.

[55]:Luna.M.D.C,Edgar.E.D,Genuino.D.A.F,Futalan.C.M :M-W Wan. Adsorption ofEriochrome Black T (EBT) dye using activated carbon prepared from waste rice hulls optimisation, isotherm and kinetic studies. Journal of the Taiwan Institute of ChimicalEngineers 44 (2013) 646-653.

[56]: L. Yu, Y-M Luo: The adsorption mechanism of anionic and cationic dyes by Jerusalem artichoke stalk-based mesoporous activated carbon. J. of EnvironmentalchemicalEngineering 2 (2014) 220-229.

[**57]:CARDOT.C :** les traitements de l'eau. Procédés physico-chimiques et biologiques (Cours et problémes) . Edition Ellipses ; 1999.

[58]:Tace, Mostfa.El. : Etude cinétique de la dégradation des chloroethanes et de S.triazins en milieu aqueux par irradiation UV en absence et en présence de H_2O_2.université de Poitiers. 1993. Thèse de doctorat.différents solutés à solubilité limitée

[59]:Delaat.J. :contribution à l'étude du mode de ll'élimination de molécules organiques modéles sur le charbon actif en grain. Interaction entre les processus d'adsorption et de biodégradation. Université de poitiers. 1988. Thése de doctorat de 3éme cycle

[60] :Petit.N : Couplage des procédés d'adsorption sur charbon actif et de photocatalyse TiO2 / UV pour l'élimination de composés organiques volatils, thèse doctorat, Université de Rennes 1 (2007).

[61] : L.M. Sun et Meunier. **F**: Adsorption : aspects théoriques Techniques de l'ingénieur, (2007). J 2 730.

[62]:Anjaneyulu.Y ,Chary.N.S , SumanRaj.D.S:Decolourization of industrial effluents - available methods and emerging technologies, a review, Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 4(2005)245–273

[63]:Forgacs.E ,Cserhati.T, Oros.G : Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review, Environment International, 30(2004) 953– 971

[64]:Swamy.J, Ramsay.J.A, The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes, Enzyme and Microbial Technology, 24 (1999)130–137

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

[66]:Sumathi.S, Manju.B.S: Uptake of reactive textile dyes by Aspergillusfoetidus, Enzyme Microbiology Technology, 27(2000)347–355

[67]:Couto.S.R: Enzymatic biotransformation of synthetic dyes, Current Drug Metabolism, 10(9) (2009)1048–1054

[68]:Couto.S.R,Herrera.J.L.T : Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, Biotechnology Advances, 24(2006) 500–513

[69]:Grigorenko.V.G, Andreeva.I.P, Rubtsova1. M.Y, Egorov.A.M: Recombinant Horseradish Peroxidase: Production and Analytical Applications, Biochemistry (Moscow), 80(4) (2015) 408-416

[70]:Souza0S.M.A.G.U ,Forgiarini.E, de Souza.A.A.U: Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP), Journal of Hazardous Materials, 147(2007)1073–1078

[71]:Veitch. N.C: Molecules of interest: Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, Phytochemistry, 65 (2004) 249–259

[72]:Montellano .P.R.O: Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases, Chapter 5, Biocatalysis Based on Heme Peroxidases, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010) 79-102

[73]:Zakharova .G.S, Uporov .I.V, Tishkov. V.I: Horseradish Peroxidase: Modulation of Properties by Chemical Modification of Protein and Heme, review, Biochemistry (Moscow), 76(13) (2011)1391-1401

[74]: Knutson. K, Kirzan .S, Ragauskas .A: Enzymatic biobleaching of two recalcitrant paper dyes with horseradish and soybean peroxidase, Biotechnology Letters, 27(2005) 753–758

[75]: Cooper .V.A,Nicell .J.A: Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase, Water Research, 30 (4)(1996)954-964

[76]:Shaffiq .T.S, Jegan Roy .J, Aswathinair .R, Emilia Abraham.T: Degradation of Textile Dyes Mediated by Plant Peroxidases, Applied Biochemistry and Biotechnology, (102-103) (2002)315-326

[77]: Yoshida .K,Kaothien .P, Matsui .T, Kawaoka .A, Shinmyo .A: Molecular biology and application of plant peroxidase genes, Applied Microbiology and Biotechnology, 60 (2003) 665–670

[78]:Jouili .H, Bouazizi .H, El Ferjani .E: Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress, review, ActaPhysiologiaePlantarrum, 33 (2011) 2075–2082

[79]:Adam .W,Lazarus .M, Saha-Moller .C.R, Weichold .O, Hoch .U, Haring .D, Schreier .P: Biotransformations with Peroxidases, Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, 63(1999)73-108

[80]:Erkurt .E.A, Erkurt .H.A, Unyayar.A: Decolorization of Azo Dyes by White Rot Fungi. Biodegradation of Azo Dyes, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010)157-167

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

[**82]:Moreira .M.T, Palma .C, Mielgo .I, Feijoo .G, Lema .J.M**:In vitro degradation of a polymeric dye (Poly R-478) by manganese peroxidase, Biotechnology and Bioengineering, 75(2001)362–368

[83]:Saratale .R.G, Saratale .G.D, Chang .J.S, Govindwar .S.P: Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42 (2011)138–157

[84]: Albino .A.D, Sampaio .A, Bezerra .R.M: Environmental Applications of Fungal and Plant Systems: Decolourisation of Textile Wastewater and Related Dyestuffs. Environmental Bioremediation Technologies, chapitre 19 (2007)445-463

[85]:Ratna, Padhi .B.S: Pollution due to synthetic dyes toxicity & carcinogenicity studies and remediation, International Journal of Environmental Sciences, 3(3) (2012) 940-955 Référencesbibliographiques

[86]:Reihmann .M, Ritter .H: Synthesis of Phenol Polymers Using Peroxidases, Advanced in Polymer Science, 194(2006)1–49

[87]:Nilesh .P.T, Chaudhari .S: Degradation of azo dyes by sequential Fenton's oxidation and aerobic biological treatment, Journal of Hazardous Materials, B136(2006)698-705

[88]:Wagner .M, Nicell .J.A: Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide, Water Research, 36(2002)4041–4052

[89]:Dalal .S, Nath Gupta .M: Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering, Chemosphere, 67(2007)741–747

[90]:Akhtar .S, Husain .Q: Potential applications of immobilized bitter gourd (Momordicacharantia) peroxidase in the removal of phenols from polluted water, Chemosphere, 65(2006) 1228–1235

[91]:Regalado .C, Garcia-Almendarez .B.E, Duarte-V´azquez .M.A: Biotechnological applications of peroxidases, Phytochemistry Reviews 3 (2004)243–256

[92]: Casella .L, Monzani .E, Nicolis .S: Potential Applications of Peroxidases in the Fine Chemical Industries Chapter 6, Biocatalysis Based on Heme Peroxidases, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010)111-153