

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



Département de Génie de l'Environnement
Laboratoire des Biotechnologies Environnementales



Mémoire de Magister

Thème

**EFFET DU CHAMP ELECTRIQUE SUR L'HYDROLYSE
ENZYMATIQUE DES GRIGNONS
D'OLIVE**

Présenté par : BENSADALLAH LEILA

**Promoteurs :
Dr. H. LOUNICI
Dr Ing. N. ABDI**

Année Universitaire 2004-2005

ملخص

الهدف من هذا البحث هو دراسة الإماهة الإنزيمية للنفايات الصلبة الناتجة عن إنتاج زيت الزيتون. قمنا في البداية بتعيين المحتوى الكيميائي للنفايات المعالجة و غير المعالجة بالصودا. مدى تأثير الحقل الكهربائي على التفاعل الإنزيمي: لقد قمنا في بداية هذه المرحلة بتطبيق حقل كهربائي قيمته 2.57 فولط/متر على النفايات المعالجة و غير المعالجة بالصودا، ثم بحثنا عن القيمة المثالية للحقل الكهربائي المستعمل. إستعملنا مخطط تجريبي لإنجاز دالة من الدرجة الأولى لتمثيل ظاهرة الإماهة الإنزيمية.

الكلمات الأساسية:

الإماهة الإنزيمية، سيلولوز، سيلولاز، النفايات الصلبة لزيت الزيتون، الحقل الكهربائي.

Résumé :

Nous avons étudié les caractéristiques chimiques d'un grignon d'olive traité et non traité à la soude. La faisabilité du couplage hydrolyse enzymatique par rapport au champ électrique a été étudiée. Nous avons appliqué une valeur du champ électrique de 2,57 Volt par mètre sur un grignon traité et non traité à la soude. Nous avons optimisé le champ électrique. A la fin, nous avons utilisé le plan d'expérience pour construire un modèle de premier ordre, afin de modéliser le phénomène d'hydrolyse.

Mots clés : *Grignon d'olive, champ électrique, plan factoriel, hydrolyse enzymatique*

Abstract :

The aim of this work is the study of the enzymatic hydrolysis of solid residues of olive oil factories.

The ability of electric filed of enzymatic saccharification was studied. We have applied a value of 2,57V/m of a solid mill olive traited and not traited with NaOH. We have optimised the electric filed. In the end we have use design of experiments to construct a first order model to modelise the phenomena.

Key words:

Enzymatic hydrolysis, cellulose, cellulose, solid mill olive, electric filed.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de mon grand père

A ma grand mère

A mes chers parents, pour leurs encouragements et sacrifices,

A mes chers frères,

A ma tante Zohra,

A mes oncles,

A mes tantes maternelles,

A toutes mes amies, R. Nadia, D. Leila, D. Hajer, T.H. Nawel, K. Samira,

B. Lynda M. Dalila en particulier H. Dalila pour sa fidélité et sa compréhension et surtout pour sa patience.

A toute ma famille.

REMERCIEMENTS

Dieu merci pour le courage et la volonté sans lesquels mon travail n'aurait jamais pu voir la lumière de ce jour.

Le présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire des Biotechnologies du Professeur N.MAMERI de l'Ecole Nationale Polytechnique, Département de Génie de l'Environnement, qu'il trouve ici mes sincères remerciements.

Ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements s'adresse à Mr H.LOUNICI et M^{me} N. ABDI, qui ont bien voulu encadrer ce mémoire et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, ainsi que pour avoir été disponible tout au long de cette étude et leurs nombreux et précieux conseils.

Mes vifs remerciements à Mr N.MAMERI pour l'honneur qu'il ma fait en présidant le jury de ma soutenance.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont pris la peine d'examiner ce travail à savoir M^{me} L. DJABRI, M^{me} . MOUHALBI et Mr M. DROUCHE.

J'exprime ma profonde reconnaissance envers tous ceux et celles qui ont participé à la réalisation de ce travail à savoir : Mr SAADA enseignant au département génie minier de l'ENP, Mr T. AHMED ZAID et Mr HADJADJ du département génie chimie de l'ENP. Mr R. DJEBAR du laboratoire physiologie végétale de l'USHTHB, Mr B. ZEKI du laboratoire zootechnie de l'INA, Mr AMRANI du laboratoire biologie des sols de l'USHTHB, M^{me} N. YEDDOU et Mr A. TALEB de l'institut de chimie industrielle de l'USTHB.

Ma reconnaissance va également à Mr ZEKRI responsable au niveau du laboratoire de la police scientifique.

Un énorme remerciement assez particulier est adressé à M^{me} Z. BETACHE du laboratoire des explosifs et M^{me} H. MELAAB du laboratoire de chimie légale de la police scientifique.

Je tiens à remercier aussi Mr K. AIT OURAB directeur des statistiques au ministère de l'agriculture.

Mes remerciements vont également à Mr MEKLATI directeur du CRAPC et Mr BADJAH ainsi que B. LYNDA, M. DALILA, K. AMINA, ZAHIA, SORAYA et NACERA du CRAPC.

Mes remerciements les plus sincères s'adresse à M^{me} R. SMAR de l'hôpital de Kouba.

Je remercie vivement H. DALILA, B. RACHIDA, S. NAIMA et L. HASSIBA ainsi que les étudiantes du laboratoire des biotechnologies et du laboratoire environnement pour leur contribution.

Liste des tableaux

Tableau N ⁰ 1 : Situation du patrimoine oléicole dans les principaux pays producteurs.....	4
Tableau N ⁰ 2: composition chimique de l'olive mûre en % de la matière sèche.....	6
Tableau N ⁰ 3 : Composition chimique des grignons d'olives.....	8
Tableau N ⁰ 4 : principales activités d'application des plans d'expériences.....	35
Tableau N ⁰ 5: Première lignes de la <i>matrice d'Hadamard</i>	37
Tableau N ⁰ 6: Matrice d'expérience factorielle ^{2⁶}	38
Tableau N ⁰ 7 : Caractéristiques chimique du grignon d'olive non prétraité.....	49
Tableau N ⁰ 8 : Les teneurs moyennes en éléments minéraux.....	50
Tableau N ⁰ 9 : Caractéristiques chimique du grignon d'olive prétraité.....	51
Tableau N ^o 10 : concentrations du cellobiose et du glucose.....	66
Tableau N ^o 11 : Les conditions expérimentales.....	72
Tableau N ^o 12 : Plan d'expérimentation utilisé lors de l'hydrolyse enzymatique du grignon d'olive.....	73
Tableau N ^o 13 : Résultats des essais du plan d'Hadamard.....	76
Tableau N ^o 14: Détermination des coefficients du modèle.....	77
Tableau N ^o 15 : Statistique de la régression du modèle.....	77
Tableau N ^o 16 : analyse des résidus.....	79

Annexe

Tableau N ⁰ 17 : matériels utilisés	
--	--

Liste des figures

Figure N ^o 1 : Processus de production d'huile d'olive.....	5
Figure N ^o 2 : Composition physique de l'olive.....	6
Figure N ^o 3 : Structure de la paroi végétale.....	10
Figure N ^o 4 : Molécule de cellulose sous la configuration chaise.....	11
Figure N ^o 5 : Conformation des alcools qui forme la lignine.....	13
Figure N ^o 6 : Schéma de la boîte noire.....	32
Figure N ^o 7 : schéma du bioréacteur.....	45
Figure N ^o 8 : schéma du bioréacteur couplé à un générateur.....	46
Figure N ^o 9 : Evolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps.....	52
Figure N ^o 10 : Evolution du rendement d'hydrolyse en fonction du temps.....	52
Figure N ^o 11 : Evolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps.....	55
Figure N ^o 12 : Evolution du rendement d'hydrolyse en fonction du temps.....	55
Figure N ^o 13 : Evolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps.....	57
Figure N ^o 14 : Evolution du rendement d'hydrolyse en fonction du temps.....	58
Figure N ^o 15a : Evolution du rendement d'hydrolyse en fonction du champ électrique.....	59
Figure N ^o 15b : Taux d'amélioration du rendement apporté par le champ électrique en fonction de la valeur appliquée ($T^0= 50^0C$, $pH=5$, $En/S=0.1$).....	59
Figure N ^o 16 : Evolution de la concentration du glucose en fonction du temps pour différentes valeurs du champ électrique.....	61
Figure N ^o 17 : Evolution du rendement du glucose en fonction du temps.....	61
Figure N ^o 18 : Evolution du rendement du glucose en fonction du champ électrique.....	62
Figure N ^o 19 : Chromatogramme du cellobiose pour l'échantillon 1.....	63
Figure N ^o 20 : Chromatogramme du glucose pour l'échantillon 1.....	63
Figure N ^o 21 : Chromatogramme du cellobiose pour l'échantillon 2.....	64
Figure N ^o 22 : Chromatogramme du glucose pour l'échantillon 2.....	64
Figure N ^o 23 : Evolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps.....	67
Figure N ^o 24 : Influence du champ électrique sur l'hydrolyse enzymatique.....	69
Figure N ^o 25a-25b : Courbes de régression.....	78
Figure N ^o 25c-25e : Courbes de régression.....	79
Figure N ^o 26 : Les résidus.....	80
Annexe	
Figure N ^o 27 : Evolution de la densité optique en fonction de la concentration des sucres réducteurs.	
Figure N ^o 28: Courbe d'étalonnage du glucose	
Figure N ^o 29 : Courbe d'étalonnage du cellobiose	

Liste des abréviations :

H : Taux d'humidité.

MS : Matière sèche.

MG: Matière grasse.

NDF: Neutral Detergent Fibber.

ADF: Acid Detergent Fibber.

ADL : Acid Detergent Lignin.

CMC: Carboxyméthyle cellulose.

C_s: Concentration des sucres réducteurs produits.

C_{cellulose} : Teneur en cellulose dans le milieu à t=0.

En/S : Masse en gramme de l'enzyme /masse en gramme du substrat.

S : Masse du substrat (g).

R : Masse en gramme du grignon d'olive/ masse en gramme de la soude.

T° : Température de l'hydrolyse enzymatique.

E : Champ électrique (V/m).

X₁ : Température du processus de prétraitement (°C).

X₂ : Masse en gramme du grignon d'olive/ masse en gramme de la soude.

X₃ : pH du mélange réactionnel.

X₄ : Température de l'hydrolyse enzymatique (°C).

X₅ : Masse en gramme de l'enzyme /masse en gramme du substrat.

X₆ : Champ électrique (V/m).

Y : Rendement d'hydrolyse exprimé en %.

Introduction.....	1
Etude bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur l'oléiculture et la valorisation des sous produits de d'olivier..	3
I.1- La production oléicole	3
I.2-Technologie de production de l'huile d'olive.....	4
I.3-La composition de l'olive.....	6
I.4-Les sous produits de l'oléiculture.....	7
I.5-Valorisation des sous produits de l'oléiculture.....	7
a) Valorisation des coques	7
b) Valorisation des eaux de végétation	7
c) Valorisation des grignons	8
I.6- Composition chimique des grignons d'olives	8
Chapitre II : Les résidus ligno-cellulosiques	10
II.1- Composition- Structures- Propriétés	10
II.1.1-La cellulose	11
II.1.2- Hémicellulose	12
II.1.3-Lignines	12
II.2-Les principales voies de valorisation des résidus lignocellulosique.....	13
II.2.1- L'alimentation animale	14
II.2.2- La production de sucres	15
II.2.3 -La fermentation alcoolique	14
II.2.4- La production de furfural	14
Chapitre III : Les enzymes	15
III.1-Classification des enzymes.....	15
III.2- Les enzymes cellulosiques.....	16
Les cellulases bactériennes	16
Les cellulases fongiques	16
III.2.1- L'endoglucanase (1-4- β -D-glucane glucohydrolase : E.C.3.2.1.4)	17
III.2.2- L'exoglucanase (1-4- β -D-glucane cellobiohydrolase : E.C.3.2.1.91)	17
III.2.3- Cellobiase (β -D-glucoside-glucohydrolase : E.C.3.2.1.21)	18
III.3- Mode d'action des cellulases	18
III.3.1- Modèle de Reese	18
III.3.2- Modèle d'Eleleigh et Montenecourt	18
III.3.3-Modél actuel basé sur le synergisme	19
Chapitre IV : Les prétraitements	20
IV.1- Prétraitements physiques	20
1-Le broyage	20
2- Pyrolyse	20
3- Irradiation à haute énergie	21
4- Prétraitements à la vapeur	21
IV.2- Prétraitements chimiques	21
IV.2.1-Les prétraitements alcalins	21
IV.2.2-Les prétraitements acides	22
IV.2.3-Solvants de la cellulose	22
IV- Prétraitements biologiques.....	22
Chapitre V : Généralités	24
a- Théorie de la double couche	24
b- Potentiel Zêta	25
c- Passage du courant	25
d- Mobilité ionique U	25

II- Application du champ électro- magnétique dans les sciences de la vie	26
Chapitre VI : La modélisation par plan factoriel	32
VI.1-Introduction.....	32
VI.2-Planification d'expériences.....	32
VI.3-Définition	33
VI.4-Notions sur les plans d'expériences.....	34
VI.4.1- Avantages des plans d'expériences.....	34
VI.4.2- Domaines d'application des plans d'expériences.....	34
VI.4.3-Différents modèles.....	35
VI.4.4-Différents plans d'expériences.....	36
VI.4.4.1- Matrices d'Hadamard.....	37
VI.4.4.2- Matrices factorielle complète 2 ⁿ	38
VI.5- Définition des effets principaux et des interactions.....	39
VI.5.1- L'effet principal.....	39
VI.5.2-Les interactions.....	39
VI.5.2.a- Interaction deux à deux.....	39
VI.5.2.b- Interaction de plusieurs facteurs.....	39
VI.6- Validation du modèle	40
a) Analyse de la corrélation.....	40
b) Analyse des résidus.....	40
c) Analyse de la régression.....	40
d) Seuil de confiance	41
Etude expérimentale	
Partie I	
I- Introduction	42
II- Caractéristiques des produits utilisés	42
II.1-Caractérisation et prétraitement des grignons d'olive	42
II.1.1-Préparation du substrat	42
a- prétraitement physique	43
b- prétraitement chimique	43
II.1.2- Détermination des caractéristiques chimiques des grignons d'olive	43
II.2- Caractéristiques de l'enzyme	45
II.3-Dispositif expérimental	45
Essai sans application d'un potentiel	45
Essai avec application d'un potentiel électrique	47
II.4- Matériel et méthodes	48
II.5- Calcul du rendement d'hydrolyse	48
Partie II	
I- Caractéristiques chimique du grignon.....	49
I.1- Caractéristiques chimique du grignon d'olive non prétraité	49
I.2- Caractéristiques chimique du grignon d'olive prétraité à la soude	50
II- Hydrolyse enzymatique des grignons d'olive	52
II.1-Essai de faisabilité du couplage bioréacteur/champ électrique	52
a- Influence du champ électrique sur un grignon traité	52
b- Influence du champ électrique sur un grignon non traité	54
III- Hydrolyse enzymatique d'un rejet d'huilerie dans un réacteur couplé à un champ électrique.....	57
III.1-Optimisation du potentiel électrique	57
IV- Plan d'expérimentation.....	71

IV.1- Désignation des variables d'entrée et de sortie.....	71
IV.2- Elaboration des plans d'expériences.....	72
Expression des résultats.....	74
Interprétation des résultats.....	75
II.5.1-Application du modèle d'ordre un sans interaction.....	77
Le modèle mathématique postulé	78
Conclusion	82

Introduction

L'épuisement des ressources de la terre, la pollution de toute sorte (rejets industriels et agricoles) sont autant de problèmes environnementaux d'actualité.

La production annuelle des résidus cellulosiques terrestres est évaluée à $4 \cdot 10^9$ tonnes [1].

L'utilisation de la cellulose et des hémicelluloses présente plusieurs intérêts :

- la production d'énergie par combustion directe ou par fermentation en méthane ou méthanol ;
- la conversion en produits chimiques de base (solvants, acides organiques, alcools...);
- la production de protéines pour l'alimentation animale.

L'olivier, arbre typique des régions sèches et chaudes, constitue une composante familière des pays du bassin méditerranéen et représente pour beaucoup d'entre eux une des principales cultures traditionnelles [2].

L'industrie oléicole engendre en plus de l'huile comme produit principal, de grandes quantités de sous produits (grignon d'olive et margines), résidus lignocellulosiques dont les effets nocifs dérivent en grande partie de leur contenu en polyphénols. La valorisation de ces résidus est devenue une nécessité pour éviter une pollution de plus en plus cruciale.

La valorisation des composés lignocellulosiques a fait l'objet de plusieurs recherches orientées par le développement des systèmes enzymatiques. L'hydrolyse enzymatique de ces composés conduit à la production de sucres et autres produits [3].

De même, le développement de l'électricité comme nouvelle source d'énergie, l'aspect non polluant et les facilités d'automatisation qu'elle apporte, ont amené les industriels et les chercheurs, à préconiser dans beaucoup de cas, l'utilisation d'un champ électrique dans différents procédés. Cela a permis d'améliorer les capacités de rendement de l'extraction d'huile et de jus de fruit [4], ainsi que les performances de procédés utilisant l'ultrafiltration [5] ainsi que l'adsorption [6].

Le travail exposé dans ce mémoire a pour objectif d'étudier l'effet du champ électrique sur la saccharification enzymatique des grignons d'olive en présence de l'enzyme *Trichoderma reesei*.

Cette étude a été développée en deux grandes parties :

-Une partie bibliographique, dans laquelle nous présentons :

- des généralités sur l'oléiculture ;
- des généralités sur la biomasse lignocellulosique ;
- des définitions sur les enzymes cellulolytiques ;
- les prétraitements utilisés dans le cas d'une biomasse lignocellulosique ;
- application du courant électrique dans le domaine des sciences naturelles et
- quelques aspects sur la modélisation par planification d'expériences.

Et une partie expérimentale : dans laquelle nous présentons :

- les caractéristiques d'un substrat prétraité et non traité ;
- l'étude de l'effet de l'application d'un champ électrique sur l'hydrolyse enzymatique des grignons d'olive traité et non traité;
- optimisation de l'application du champ électrique lors de l'hydrolyse enzymatique réalisée en réacteur discontinu et
- l'utilisation d'un plan d'expérimentation lors de l'hydrolyse enzymatique du grignon d'olive.

Généralités sur l'oléiculture et la valorisation des sous produits de l'olivier

I.1- LA PRODUCTION OLEICOLE :

L'**olivier** est un arbre de la famille des Oléacées et du genre *Olea*, il est cultivé dans les régions de climat méditerranéen pour son fruit, l'olive qui donne une huile recherchée. Il comprend huit espèces, dont *Olea europea*, celle-ci se divise en deux sous espèces *Olea europea silvestris* et *Olea europea sativa* [7]. En effet les 98% du verger mondial d'oliviers sont concentrés dans cette région. Actuellement dans le monde, on peut compter pas moins de 800 millions de ces arbres recouvrant environ 10 millions d'hectares. L'Algérie, un des pays producteurs d'huile d'olive, dispose actuellement d'un patrimoine oléicole évalué à plus de 17 million d'oliviers occupant environ 165000 hectares et représentant près de 37% de la surface arboricole nationale[8].

Les variétés principalement rencontrées dans notre pays à savoir : le Chemlal (50%), l'Azeradg (5%), le Bouchouk et le Limli (2%), sont cultivées en Kabylie. Dans l'Oranie, la Sigoise (20%) est la variété prépondérante. A coté des ces variétés locales, on dénombre aussi des espèces introduites d'Espagne, de France et d'Italie, comme le Cornicobra, le Luque et le Frantoïo [8].

Le tableau N^o1 donne le nombre d'oliviers et la superficie recouverte par ces variétés dans les principaux pays producteurs :

Tableau N°1 : Situation du patrimoine oléicole dans les principaux pays producteurs [8,9]

Pays	Nombre d'arbres	Superficie (en hectare)	Production d'olive en MT
Espagne	188 745 000	2 113 444	6 780
Italie	181 800 000	2 139 214	2 894
Grèce	117 552 000	826 260	2 249
Turquie	82 000 000	820 000	600
Tunisie	55 963 000	1 418 800	550
Syrie	26 500 000	250 000	497
Portugal	49 496 000	1 114 000	271
Maroc	73 000 000	330 000	420
Algérie	17 547 400	164 290	300

I.2- TECHNOLOGIE DE PRODUCTION DE L'HUILE D'OLIVE :

La quantité de produit obtenue dépend de la rapidité du traitement, de la durée du stockage et des différentes précautions à prendre en considération pour éviter le développement des microorganismes par le biais de la blessure du fruit [10]

Le système de production d'huile d'olive comprend en général cinq opérations qui sont représentées sur la Figure N°1 [11] :

- 1- Tri des olives : le premier stade du cycle de production de l'huile consiste à trier les olives pour les séparer des corps étrangers [12].
- 2-Lavage : le lavage des olives, après triage à l'arrivée au moulin, permet d'éviter l'augmentation du taux d'acidité, lié à la présence d'impuretés [12].
- 3-Broyage : l'opération a pour objectif de supprimer les tissus végétaux et de permettre la libération des gouttelettes d'huile [12].
- 4-Malaxage : le broyage doit être complété par un malaxage. Cette opération a pour but d'extraire tout ce qui reste d'huile dans les vacuoles, d'agréger les gouttelettes d'huile en grosses gouttes et de former des poches de phase huileuse continue.

Séparation des phases solide et liquide : La pâte d'olive, obtenue est alors composée d'extrait sec, d'huile et d'eau de végétation ces derniers sont recueillis, tandis

que la phase solide appelée « grignon » de masse volumique de 1.2Kg/l est rejetée [11,12].

5-Séparation : Après avoir éliminé, par tamisage, les dernières particules solides, la décantation et de la centrifugation conduisent à deux phases : l'huile vierge de masse volumique égale à 0.916 Kg/l et l'eau appelée « margine » de masse volumique 1.086 Kg/l [11,12].

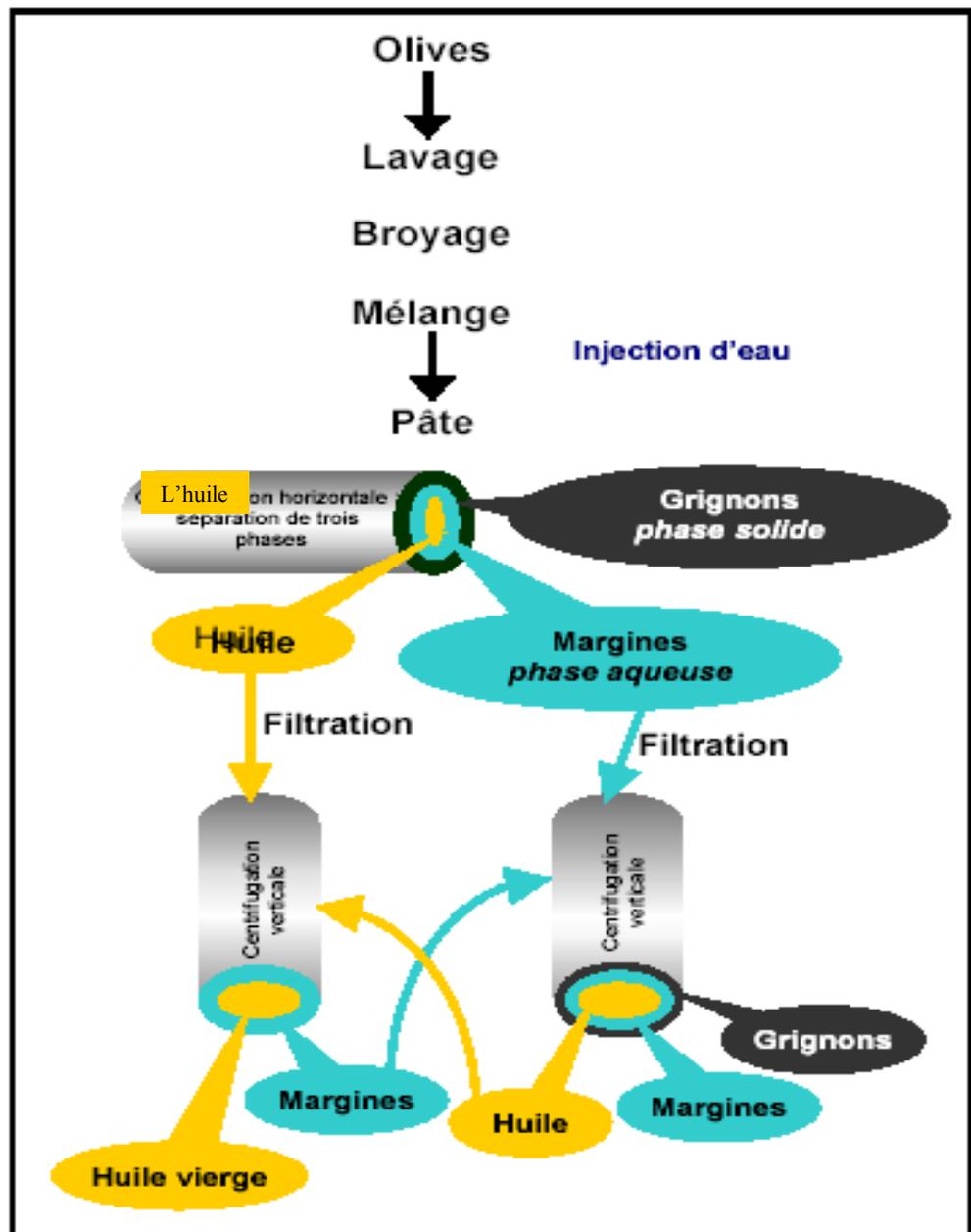


Figure N°1 : Processus de production d'huile d'olive [11]

I.3-LA COMPOSITION DE L'OLIVE :

L'olive est une drupe, c'est à dire, un fruit charnu à noyau ; elle est de forme ellipsoïdale [13]. Sa composition physique est indiquée sur la Figure N°2. Sa composition chimique moyenne est indiquée dans le Tableau N°2.

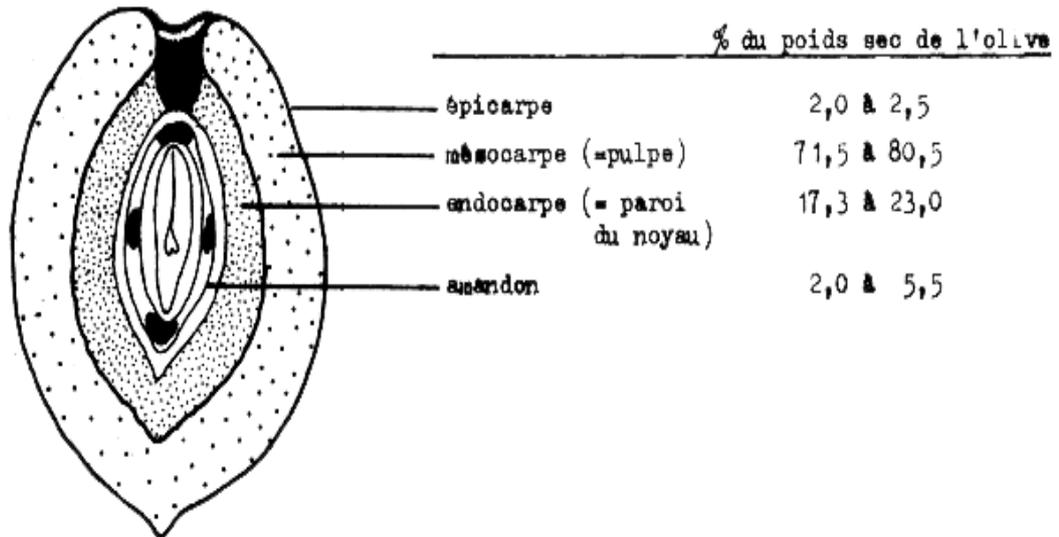


Figure N°2 : Composition physique de l'olive [14].

Tableau N°2: composition chimique de l'olive mûre en % de la matière sèche [14].

	Epicarpe	Mésocarpe	Endocarpe+ Amandon
Cendres totales	1,6	2,3	1,2
Matières azotées	9,8	9,6	1,3
Matières grasses	3,4	51,8	0,8
Cellulose brute	2,4	12	74,1
Extractifs non azotés	82,8	24,3	22,6

I.4-LES SOUS PRODUITS DE L'OLEICULTURE :

La technologie d'extraction d'huile d'olive est très variable, et a fait l'objet d'importantes modifications durant ces dernières décennies.

Les deux procédés d'extraction les plus utilisés actuellement sont la pression et la centrifugation.

Il existe d'autres procédés comme le procédé Acapulco, qui comprend la séparation préalable du noyau et de la pulpe avant l'extraction de l'huile.

Le procédé classique d'extraction d'huile d'olive par pression produit en moyenne pour une quantité de 100 Kg d'olives : [15].

-35 Kg de grignon ;

-100 litres de margines.

I.5-VALORISATION DES SOUS PRODUITS DE L'OLEICULTURE :

Les sous produits de l'oléiculture, tels les grignons d'olives, les coques et les eaux de végétation, sont rejetés en quantités très importantes. Ils sont généralement nuisibles à l'environnement. Des recherches ont été entreprises dans le but de les valoriser à l'échelle industrielle.

- a) Valorisation des coques : ces rejets possèdent une forte valeur énergétique, leur permettant de servir comme combustible, assurant ainsi la couverture énergétique des huileries, voire des savonneries qui leurs sont souvent adjacentes. Les cendres produites par la combustion des noyaux peuvent également servir d'engrais en raison de leur teneur importante en oxyde de potassium [16,17].
- b) Valorisation des eaux de végétation : les margines ou eaux de végétation sont des résidus aqueux accompagnant l'huile pressée, à forte charge polluante et à pH acide. Ils contiennent des sous-produits hydrosolubles à potentialité et valeur marchande non négligeables : sucres ; certains fermentescibles en alcool (raffinose, mannose, saccharose, glucose, arabinose et xylose) et alcools dérivés ; des polyphénols à effet conservateur par leur pouvoirs antioxydant et antibactérien [16]. Ces eaux sont employées comme engrais liquides, fertilisants et composts. Des chercheurs espagnols [18] ont par ailleurs

développé une méthode consistant à extraire de ces eaux des levures de type « candida » servant à les épurer. La teneur en sucres, facilement assimilable de ces eaux, les sels minéraux font un champ idéal pour le développement de ces levures [18].

- c) Valorisation des grignons : les grignons d'olive mélangés à des fourrages sont utilisés comme aliment pour le bétail. Ils sont également utilisés dans la production continue du furfural par hydrolyse acide et d'alcool par saccharification. Aux USA, les grignons d'olive sont utilisés principalement pour le nettoyage de certaines surfaces métalliques par sablage [16,17], ils sont utilisés aussi comme charbon actif [19]. L'hydrolyse enzymatique des grignons d'olive prétraités à la soude par des cellulases de *Trichoderma reesei* dans un réacteur en batch conduit à un rendement en sucres réducteurs de 50% après 24 h d'hydrolyse [3], tandis qu'en réacteur continu couplé à l'ultrafiltration le rendement est de 45% après 14 h d'hydrolyse [20].

I.6- COMPOSITION CHIMIQUE DES GRIGNONS D'OLIVES :

La composition chimique des grignons d'olives est donnée dans le Tableau N⁰3, elle varie selon plusieurs paramètres :

- L'espèce de l'olive ;
- Le stade de maturité ;
- Le procédé d'extraction de l'huile ;
- L'épuisement.

Tableau N⁰3 : Composition chimique des grignons d'olives [21]

Type de grignon	Brut	Epuisé	Tamisé	Epuisé-tamisé
Matière sèche	69-90	86-95	89-95	88-90
Cendres totales	3-14,5	5,8-9,3	10-25,3	11-23
Matière azotée	5-10,3	12,4-16,2	6,8-9	9,6-11,3
Matière grasse	5,3-12,5	1,1-7,4	6,9-15	2-6,5
Cellulose brute	32-47,5	32-53,3	12-33,5	14-26,3

- La matière sèche : elle varie selon le type de grignon. La presse hydraulique et la super presse laissent un grignon à 25% d'humidité contre 60% pour la presse continue [22].
- Les matières minérales : des teneurs en cendres de 4 à 5 fois plus importantes que celles considérées comme une moyenne (5% de la matière sèche) sont rapportées par plusieurs auteurs. Cet excès est attribué à une contamination par le sable au niveau des huileries. Le potassium et le calcium apparaissent comme les éléments prédominants, suivis du phosphore et du sodium [14].
- Les matières grasses : la teneur en matière grasse est souvent élevée et est fonction du mode d'extraction de l'huile. La pression laisse des grignons et pulpes riches en matières grasses (30% de matières grasses en moyenne). L'épuisement par un solvant la réduit à 4-5% de la matière sèche, ce qui explique l'intérêt de cette opération. La matière grasse du grignon d'olive est riche en acides (caprylique, caproïque, oléique et linoléique) [14].
- Les fibres brutes : la teneur en cellulose brute est également élevée et varie de 15 à 50% de la matière sèche, elle dépend de la proportion des coques présents dans le résidu. Ces coques renferment 74% de fibres brutes contre 2,43% et 12,01 contenus respectivement dans la pellicule et la pulpe [22].
- Matières azotées totales : la teneur en matières azotées totales varie selon le type de grignon. La grande partie de l'azote (80 à 90%) est liée à la fraction lignocellulosique ce qui explique sa faible solubilité, d'où le grignon d'olive est pauvre en protéines [14].
- Les composés phénoliques : les polyphénols sont présents dans l'olive à un pourcentage de 0,3 à 5% de la matière sèche, ce sont surtout des ortho diphénols. L'oleuropéine, est le composé le plus abondant et le plus caractérisé des oléagineux [14].

Les résidus ligno-cellulosiques :

II.1 COMPOSITION- STRUCTURES- PROPRIETES :

La biomasse lignocellulosique est constituée essentiellement par les parois végétales des plantes récoltées. L'anatomie de la paroi végétale est bien connue (figure N°3). Cette paroi végétale constituée de différentes couches successives dont les propriétés physico-chimiques et mécaniques s'intègrent pour donner à la paroi sa spécificité fonctionnelle.

Chimiquement, les parois végétales contiennent trois constituants principaux :
Cellulose, hémicellulose et lignine.

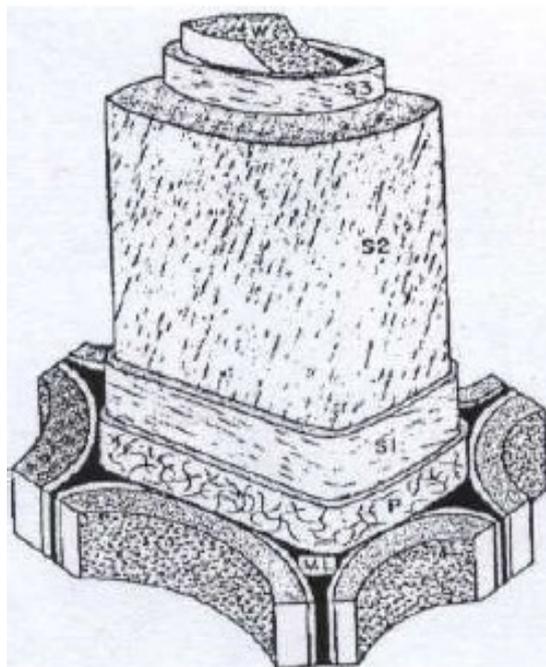


Figure N°3 : Structure de la paroi végétale [23]

II.1.1-La cellulose :

La cellulose est un biopolymère de nature fibrillaire, synthétisée dans le cytoplasme des cellules végétales, et est déposée à l'extérieur de la membrane plasmique participant ainsi au maintien de la rigidité des tissus.

La macromolécule de cellulose est constituée de monomères de glucose reliés en β (1-4), elle forme une longue chaîne tendue non ramifiée, sous la configuration chaise (figure N^o4). Le motif répétitif est constitué par deux monomères de glucose. Ce polyoside est insoluble dans l'eau sauf dans la liqueur cuproammoniacale [24-26]. La taille d'une macromolécule de cellulose est donnée par le degré de polymérisation (DP), c'est-à-dire le nombre d'unité de glucose par chaîne, il varie selon les sources de cellulose [27].

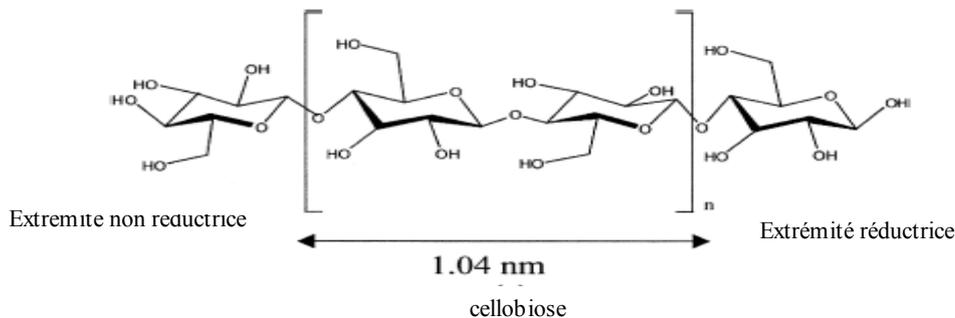


Figure N^o4 : Macromolécule de cellulose sous la configuration chaise [28].

La cellulose est le résultat de la polymérisation de glucopyranoses. Par hydrolyse acide de la fraction cellulosique, on obtient près de 90% (du poids sec) de glucose.

Parmi les nombreuses applications de la cellulose, nous nous limiterons à en citer quelques-unes [29] :

- Sans modification chimique, la cellulose sert à la fabrication du papier et dans le domaine pharmaceutique, elle sert d'additifs ou de liants utilisés lors de la préparation de comprimés, gélules ou granulés.

-D'autres dérivés de la cellulose tels que la méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose et la carboxyméthylcellulose sont utilisés comme épaississants dans l'industrie des peintures.

La cellulose est rarement rencontrée à l'état pur. Elle est synthétisée sous cet état chez certains microorganismes tels que *Acétobacter xylium*, mais la plus grande part provient des végétaux où elle représente le constituant principal des parois végétales. Dans ce cas, elle est associée à d'autres composés : l'hémicellulose et la lignine [28,30].

II.1.2- Hémicellulose :

Le nom d'hémicellulose est donné pour désigner tous les polysaccharides des plantes autres que l'amidon, la cellulose et les matières pectiques. Ils sont associés à la cellulose par des liaisons hydrogènes et qui contrairement à la cellulose sont solubles dans les bases diluées (la soude et la potasse). Ces derniers désacétylent complètement l'hémicellulose. Le degré de polymérisation varie entre 70 et 200 [31,32].

Les principaux constituants des hémicelluloses sont essentiellement des sucres en C₅ (xylose et arabinose) ; le glucose est toujours présent.

L'hydrolyse des hémicelluloses fournira donc des pentoses, non ou peu fermentescibles en éthanol, mais fermentescibles par la fermentation acétonobutylique [33].

II.1.3-Lignines :

Le terme lignine désigne un ensemble de substances voisines à l'état de copolymères de haut poids moléculaires. De façon plus précise les lignines résultent de la copolymérisation de trois monomères : l'alcool p-hydroxycinnamique, l'alcool

coniférylique et l'alcool synapylique que l'on désigne sous le terme de monolignols (Figure N°5) [24].

La proportion de ces trois alcools varie suivant l'espèce végétale, le tissu dans la plante et la localisation dans la paroi végétale.

Les liaisons qui relient les unités monomériques sont extrêmement variés, il s'agit dans tous les cas de liaisons stables, et non hydrolysables et d'autres oxydants tels que l'acide azotique, l'acide chromique et le permanganate de potassium [24].

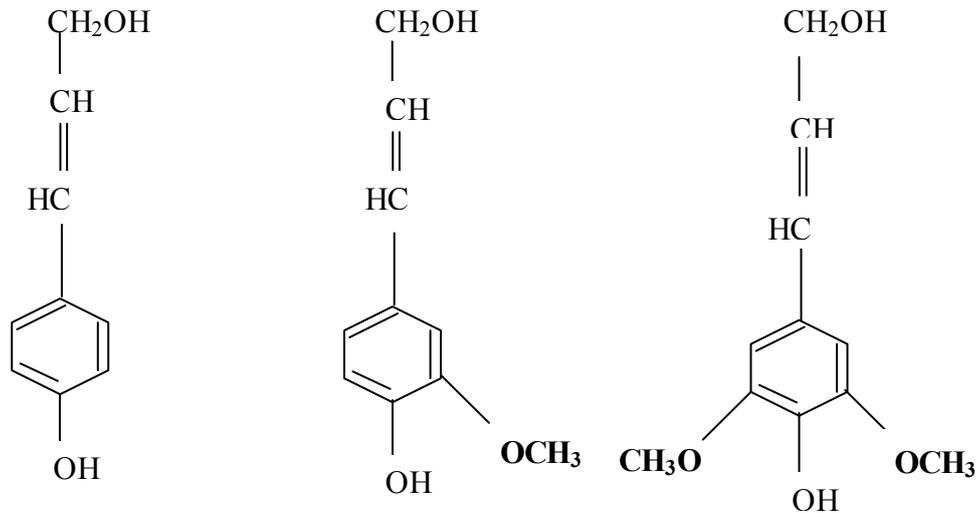


Figure N°5 : Conformation des alcools qui forme la lignine [24].

II.2-LES PRINCIPALES VOIES DE VALORISATION DES RESIDUS

LIGNOCELLULOSIQUE :

Outre la fabrication de la pâte à papier, ils présentent un intérêt dans l'alimentation animale ainsi qu'en tant que précurseurs pour la production de produits chimiques organiques, d'énergie et de matériaux polymériques. Cette utilisation variée de la biomasse s'explique par plusieurs facteurs [29] :

- le souci de préserver l'environnement,
- la nécessité de trouver un débouché au surplus des productions agricoles
- le besoin de devenir de plus en plus indépendant vis-à-vis des produits pétroliers.

II.2.1- L'alimentation animale :

La fraction polyosidique, qui constitue une part importante du matériau lignocellulosique, peut être assimilée par les ruminants. Cependant, la lignine apparaît comme élément perturbateur pour la digestibilité du bétail. De ce fait, plusieurs prétraitements de la matière lignocellulosique ont été envisagés afin de la rendre plus digeste [29].

II.2.2- La production de sucres :

Parallèlement à l'hydrolyse acide classique se faisant avec une mauvaise sélectivité, les travaux se sont orientés vers l'hydrolyse enzymatique, plus sélective, s'effectuant dans des conditions plus douces. Ainsi la cellulose peut être valorisée en tant que films plastiques biodégradables [34].

II.2.3 -La fermentation alcoolique :

Cette technique est généralement associée à l'hydrolyse. En effet, les alcools sont obtenus par fermentation des sucres issus de l'hydrolyse des hémicelluloses. Selon l'objectif visé, plusieurs processus technologiques permettent d'obtenir soit exclusivement l'éthanol ou le butanol ou bien le mélange acétonobutylique [29].

II.2.4- La production de furfural :

Le furfural est obtenu par hydrolyse acide des pentosanes de la matière végétale [29].

Les considérations précédentes mettent en relief l'importance des résidus lignocellulosiques en tant que réservoir alimentaire et énergétique pratiquement inépuisable et renouvelable contrairement aux hydrocarbures [29].

Les enzymes

Les enzymes sont des macromolécules naturelles, ou biopolymères, de masse moléculaire variable de quelques milliers à plusieurs centaines de mille, secrétées par les organismes vivants. Elles sont constituées d'enchaînements de résidus d'acides aminés. Ce sont des catalyseurs très efficaces et spécifiques. Le centre actif est généralement une petite partie de la molécule. Leur activité catalytique est liée à leur structure et à leur conformation spatiale [35].

III.1-CLASSIFICATION DES ENZYMES :

Les enzymes sont officiellement classées par la commission internationale de nomenclature des enzymes, selon la nature des réactions, en six groupes [17] :

- **Les oxydoréductases** : Catalysent les réactions d'oxydoréduction, quelque soit le mécanisme.
- **Les transférases** : Catalysent les réactions de transfert de radicaux fonctionnels d'une molécule à l'autre.
- **Les hydrolases** : Catalysent la rupture d'une liaison par fixation d'une molécule d'eau. C'est la classe qui contient la plus part des enzymes utilisées en industrie.
- **Les liases** : Catalysent des réactions qui permettent les déplacements d'un groupement sur le substrat avec apparition d'une double liaison.
- **Les isomérases** : Catalysent les réactions du type $A \rightleftharpoons B$
- **Les lipases** : Catalysent l'union de deux molécules en utilisant l'énergie fournie par la dégradation de l'A.T.P.

III.2- LES ENZYMES CELLULOSIQUES :

Dans le cas de la biomasse lignocellulosique, il existe deux systèmes enzymatiques, l'un spécifique aux hémicelluloses et l'autre spécifique à la cellulose. Il est généralement admis que les hémicelluloses ont un mécanisme d'action proche de celui des cellulases [2].

Les cellulases font partie des cytases, ancienne dénomination s'appliquant à l'ensemble des enzymes solubilisant les parois cellulaires des végétaux. Elles sont excrétées dans le milieu par un grand nombre de champignons et de bactéries durant leur croissance sur un matériel cellulosique [2].

a) Les cellulases bactériennes [31] :

De nombreuses bactéries sont capables de se développer sur un substrat cellulosique, parmi elles on trouve des bactéries aérobies et des bactéries anaérobies.

- *Sporocythophaga myxococcoïde*, une bactérie aérobie, l'activité cellulolytique est uniquement de type endoglucanase. Elle ne dégrade que la cellulose soluble ou amorphe.
- *Clostridium thermocellum*, bactérie anaérobie, une endoglucanase a été purifiée de poids moléculaire de 56000 et un point isoélectrique de 6.2 et un pH optimal de 6. Pour ces bactéries, les β glucosidases sont localisées dans le périplasma.
- *Clostridiumstercorarium*, bactérie anaérobie, une endoglucanase de poids moléculaire 91000-99000 (de point isoélectrique 3,85 et de pH optimum de 6,4) a été purifiée. Elle n'agit que sur la cellulose amorphe, mais en synergie avec une exoglucanase, elle est capable de dégrader la cellulose cristalline, libérant de la cellobiose

b) Les cellulases fongiques :

Il existe des champignons qui n'ont pas la capacité de solubiliser la cellulose cristalline (hydrolyser la cellulose en produits d'un moindre degré de polymérisation) tel que *Myrothecium verrucaria* qui libère dans son milieu de culture adéquat que de l'endoglucanase et la β glucosidas. Tandis que d'autres tels que *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Fusarium solan*, *Penicillium funiculosum*, *Phanerochaete chrysosporium/Sporotrichum pulverulentum* et *Sclerotium rolfsii*

libèrent les trois enzymes à savoir : endoglucanase, exoglucanase, cellobiase. Les cellulases les plus étudiées sont celles du *Trichoderma reesei* et *Trichoderma viride* [36].

Le *Trichoderma Reesei* est un ascomycète qui représente l'avantage d'excréter en grande quantité le mélange adéquat d'enzyme, permettant l'hydrolyse aussi bien de la cellulose que des hémicelluloses. Il est compté parmi les sources principales des préparations commerciales des cellulases.

Ce champignon est cultivé dans un milieu où le lactose représente la principale source de carbone. La présence des agents tensioactifs dans le milieu, facilite la synthèse des cellulases [35].

Les surnageants de culture de tels champignons, contiennent des endoglucanases, des exoglucanases et des β 1-4 cellobiohydrolase que l'on dose sur cellulose cristalline (cellulose microcristalline, papier filtre ou fibre de coton) [31]. Le système enzymatique cellulolytique est un complexe formé de trois différents types d'enzymes :

III.2.1- L'endoglucanase (1-4- β -D-glucane glucohydrolase : E.C.3.2.1.4) :

Ce sont des glycoprotéines dont la partie glucidique peut atteindre 20% de la masse de l'enzyme, leur point isoélectrique est acide, leur pH optimal est compris entre 4 et 7, et leur poids moléculaire est voisin de 30000 à 40000 Daltons. Dans certains cas, il est voisin de 13000 daltons [31].

III.2.2- L'exoglucanase (1-4- β -D-glucane cellobiohydrolase : E.C.3.2.1.91) :

Les exoglucanases attaquent la molécule de la cellulose en bout de chaîne, du côté non réducteur, en libérant des résidus de cellobioses, elles sont alors appelées cellobiohydrolases (CBH= β -1-4 glucane 4 cellobiohydrolase), ou bien en libérant du glucose, elles sont alors appelées glucohydrolases (GH= β -1-4 glucane 4 glucohydrolase). Elles sont également capables d'attaquer les cellodextrines, la cellulose microcristalline, et les fibres du coton [31]

III.2.3- Cellobiase (β -D-glucoside-glucohydrolase : E.C.3.2.1.21) :

Les cellobioses libèrent du glucose à partir des oligomères libérés par l'action d'endo et ou / d'exoglucanases. Leur affinité pour leur substrat augmente lorsque le degré de polymérisation décroît, et présente un maximum pour le cellobiose d'où le nom de Cellobiase fréquemment utilisé [31].

III.3- MODE D'ACTION DES CELLULASES :

Le mécanisme d'action de ces enzymes a depuis longtemps fait l'objet de controverses ; différents modèles ont été proposés au cours des années.

III.3.1- Modèle de Reese :

Reese *et al*, cités par [31] ont remarqué qu'un nombre important de microorganismes hydrolysait préférentiellement la cellulose amorphe alors que peu d'entre eux étaient capables d'utiliser la cellulose microcristalline. Ils émirent alors l'hypothèse de l'existence d'un activateur de l'hydrolyse appelé C_1 , facteur non hydrolytique. Celui-ci agirait en premier en désorganisant les chaînes de la cellulose facilitant ainsi l'action des enzymes C_x

Wood et Mc Crae [35] ont isolé et purifié le facteur C_1 de différents filtrats de culture de *Fusarium solani*, *Trichoderma viride* et *Trichoderma Koningii*, ils ont déduit que :

Le facteur C_1 est une enzyme hydrolytique contrairement à l'hypothèse émise par Reese [31].

Les enzymes C_x hydrolysent préférentiellement les dérivés solubles de cellulose. Elles opèrent loin des extrémités qui sont les points d'impact de C_1 . Il s'agit dans ce cas d'endoglucanases [30].

III.3.2- Modèle d'Eleleigh et Montenecourt :

Trois familles d'enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de la cellulose [30]:

a) Les endo-glucanases agissent au hasard à l'intérieur des fibres en l'hydrolysant les liaisons glucosidiques β -1-4 et produisant des cellodextrines.

- b) Les cellobiohydrolases libèrent des molécules à partir des extrémités non réductrices des chaînes de la cellulose.
- c) Les β -glucosidases catalysent la rupture de la liaison β -1-4 du cellobiose libérant ainsi le glucose.

III.3.3-Modèle actuel basé sur le synergisme :

L'endoglucanase coupe la liaison interne de la chaîne de β glucanase, l'extrémité non réductrice ainsi créée peut être le substrat de l'exoglucanase qui libère du cellobiose ou du glucose et agit de façon récurrente le long de la chaîne. Le cellobiose qui apparaît en solution est à son tour hydrolysé en deux unités glucose grâce à une β glucosidase. Les exoglucanases peuvent attaquer les oligosides libérés par l'action des endoglucanases et aussi la cellulose native, à partir des extrémités non réductrices et initiales.

Une synergie naît de l'action couplée des endo et exoglucanases les unes créant par leur action les sites d'initiation des autres [31].

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose permet une conversion de ce substrat en glucose sans coût élevé d'énergie. Cependant la présence de lignine est un obstacle à l'hydrolyse de la cellulose. Les cellulases dont le poids moléculaire est situé entre 38000 et 75000 ne peuvent pénétrer au travers de la matrice lignine hémicellulose qui entoure les fibrilles de cellulose, ainsi que la cristallinité de la cellulose et sa surface spécifique. L'état de la cellulose défini suivant ces trois paramètres, conditionne la vitesse et le rendement de l'hydrolyse enzymatique. Lorsque l'on envisage l'utilisation des cellulases, le mode d'organisation des polymères est donc très important à considérer. Des prétraitements physiques (broyage) et chimique permettent une accessibilité suffisante de la cellulose vis à vis des cellulases [31]

Les prétraitements

Les prétraitements visent à modifier les propriétés physiques et physicochimiques du matériau lignocellulosique, tel que le degré de polymérisation de la fraction cellulosique ou son état de cristallinité.

IV.1- PRETRAITEMENTS PHYSIQUES :

Les prétraitements physiques peuvent être mécaniques et non mécaniques. Ils ont pour but de réduire le degré de polymérisation de la cellulose et de la lignine [37].

1-Le broyage :

Il permet la réduction de la cristallinité, la diminution du degré de polymérisation, ainsi que l'augmentation de la surface spécifique [37].

2- Pyrolyse :

La pyrolyse est un processus qui augmente la susceptibilité du matériel lignocellulosique à l'hydrolyse. Au dessus de 300⁰C, la cellulose se décompose rapidement pour donner des composés gazeux et d'autres butimeux. Par contre à des températures intermédiaires, la décomposition a lieu lentement et peu de produits volatils sont formés [2].

3- Irradiation à haute énergie :

L'irradiation de la cellulose pure aboutit à une dégradation oxydative des molécules, une déshydrogénation et une destruction des unités anhydroglucoses avec libération du dioxyde de carbone. Ce prétraitement affecte la lignine et conduit à une dépolymérisation de cellulose [2].

4- Prétraitements à la vapeur :

Au cours du prétraitement à la vapeur, le substrat est porté rapidement à haute température (180⁰C-240⁰C), pour des pressions allant de 10 à 50 bars [36].

Le traitement aboutit à une hydrolyse partielle de l'hémicellulose, à une fusion de la lignine et à une déstructuration intense de la paroi du substrat, augmentant les surfaces accessibles pour les enzymes. Il s'accompagne d'une diminution du degré de polymérisation de la cellulose. L'efficacité du prétraitement dépend fortement de la température utilisée [37].

IV.2- PRETRAITEMENTS CHIMIQUES :

Bien que les prétraitements chimiques aient prouvé leur efficacité dans l'amélioration des rendements de l'hydrolyse enzymatique, ils présentent un certain nombre d'inconvénients qui ne doivent pas être négligés.

Ces prétraitements sont classés en plusieurs catégories, selon la nature chimique du réactif :

IV.2.1-Les prétraitements alcalins :

De nombreuses études ont été réalisées, soit avec uniquement de la soude [3,38] soit avec de la soude et autres produits tel que l'ammoniaque [39]. Les conditions habituelles de ces prétraitements sont : NaOH 8 à 12 %, à des temps de contact de 30 à 60 min et à des températures entre 80-120⁰C. Au cours du prétraitement, la lignine est presque en totalité solubilisée, ainsi qu'une partie des hémicelluloses (liqueurs noires) [37].

Le produit prétraité présente une excellente susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique, due à la solubilisation des hémicelluloses et des lignines, mais également à l'effet de gonflement par la soude des fibres cellulosiques les rendant plus accessibles à l'eau et aux agents d'hydrolyse. Après hydrolyse enzymatique, le taux de saccharification de la cellulose est inférieur à 30% pour une concentration en soude de 2 à 4%, alors qu'il est compris entre 80 et 90% pour une concentration en soude de 10 % [37].

IV.2.2-Les prétraitements acides :

Ces prétraitements sont réalisés par chauffage en présence d'acide sulfurique dilué, en proportion de 1 à 3% par rapport à la matière sèche lignocellulosique. Les températures et durées de traitement varient suivant les technologies utilisées. Ces traitements ont pour effet d'augmenter la surface de la cellulose accessible aux enzymes, grâce à l'extraction de la fraction hémicellulosique. Ces procédés conduisent à de bons rendements d'hydrolyse des hémicelluloses en sucres monomères, et cela améliore la digestibilité enzymatique de la cellulose [37].

IV.2.3-Solvants de la cellulose :

Les solvants tels que : l'oxyde de triéthylène, thiocyanate de strontium, améliorent sensiblement la dégradabilité de la cellulose ; le plus efficace est le cadoxen (solution alcaline d'éthylène diamine) qui permet d'atteindre des rendements d'hydrolyse proches de 90% au lieu de 20% pour le même substrat non traité. Quant à la lignine, une mixture alcalin-ethanol-eau, semble être un solvant sélectif pour le traitement de délignification [2].

IV- 3. PRETRAITEMENTS BIOLOGIQUES :

Les prétraitements biologiques mettent en œuvre certaines basidiomycètes tels que *Phanerochaete chrysosporium*, qui peuvent dans certaines conditions, dégrader activement la lignine. Des souches mutantes dépourvues de cellulases ont été obtenues et proposées pour effectuer une délignification biologique des lignocelluloses [36]. Cependant la biodégradation de la lignine est un processus

lent et les difficultés de contrôle des conditions opératoires rendent peu probables l'extrapolation de ce type de procédé [27].

Application du champ électrique dans les sciences de la vie

Nous présentons, dans ce chapitre quelques rappels sur les propriétés électriques des solutions ioniques aqueuses, et une revue de l'application du champ électrique et ou magnétique dans les sciences de la vie.

V.1-GENERALITES :

L'eau peut dissoudre un grand nombre de composés, ces derniers sont appelés solutés, l'eau est un solvant, et la phase homogène obtenue est une solution [40].

a- Théorie de la double couche :

Les colloïdes présents dans l'eau brute sont généralement chargés négativement. Afin de neutraliser cette charge, des ions positifs sont ajoutés dans le milieu, afin de former une couche autour du colloïde [41].

Diverses théories ont été avancées, dont les plus couramment cités par la littérature :

-*Théorie de Helmholtz* : Une couche d'ions positifs recouvre la surface du colloïde et assure la neutralité de l'ensemble.

- *Théorie de Gouy-Chapman* : La couche d'ions positifs est inégalement répartie autour du colloïde. La neutralité est obtenue à plus grande distance

- *Théorie de Stern* : elle rassemble les deux précédentes et considère la formation d'une double couche.

b- Potentiel Zêta :

Il est responsable du comportement électrocinétique de la particule colloïdale. Il régit le déplacement des colloïdes et leur interaction mutuelle [41].

Ce potentiel est défini par l'équation :

$$Z = 4 * \pi * e * q / \varepsilon \quad (1)$$

Avec : Z : potentiel Zêta.

e : épaisseur effective de la couche d'Helmholtz.

q : charge de l'entité mobile par unité de surface.

ε : constante diélectrique du milieu.

b- Passage du courant :

Les liquides tels que l'huile, l'eau pure et les solutions de glucose ou d'urée laissent peu ou pas du tout passer le courant électrique. Par contre, les solutions ioniques aqueuses conduisent le courant électrique, cela est dû à la présence des ions qui constituent les porteurs de charges : les cations se déplacent vers la cathode et les anions vers l'anode [42].

Cette non conductance du courant électrique est appelée résistance, la résistance électrique R d'une solution électrolytique de résistivité ρ placée dans une cuve de longueur l et de section S a pour expression [42]

$$R = \rho \frac{l}{S} \quad (2)$$

R est en ohms, ρ en ohm *m, l en m et S en m².

La conductivité électrique χ s'exprime en ohm⁻¹*m⁻¹, elle est l'inverse de la résistivité ; d'où l'expression de la conductivité :

$$\chi = \frac{l}{\rho} \quad (3)$$

c- Mobilité ionique U :

Par définition la mobilité ionique U d'un ion est la vitesse v de cet ion dans un champ électrique [42].

Un ion de charge q placé dans un champ E est soumis à une force

$$\vec{F} = q\vec{E} \quad (4)$$

Sous l'influence de cette force, l'ion se déplace dans le solvant, mais il est freiné par la viscosité du milieu qui se manifeste par la force f définie selon la loi de Stokes [42] :

$$\vec{f} = -6\pi\eta r \vec{v} \quad (5)$$

Lorsque les deux forces F et f sont égales, l'ion se déplace à vitesse constante

$$\vec{v} = \frac{q\vec{E}}{6\pi\eta r} \quad \text{Et par définition} \quad U = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (6)$$

η Le coefficient de viscosité du milieu est inversement proportionnel à la température [42].

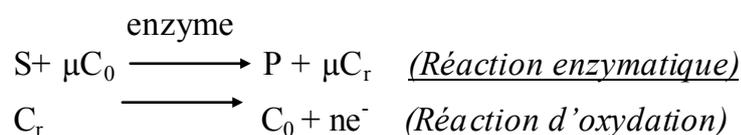
Avec : $\vec{v} = U * \vec{E}$

II- APPLICATION DU CHAMP ELECTRO- MAGNETIQUE DANS LES SCIENCES DE LA VIE :

Depuis le début des années 80, l'utilisation des techniques électriques dans les biotechnologies et en médecine a connu un énorme intérêt débouchant sur une grande variété d'applications [43].

A. Bergel *et al* [44] ont procédé à l'étude d'une réaction enzymatique avec régénération électrochimique du coenzyme, les deux processus se produisent dans un même réacteur. Cette méthode est proposée pour trois configurations, la première enzyme est entre l'électrode et une membrane semi perméable, la seconde l'enzyme est fixée sur une membrane qui est fixée sur l'électrode et la troisième enzyme est dissoute dans une solution dans laquelle l'électrode est immergée.

Dans les trois cas le coenzyme joue un rôle dans la réaction d'oxydoréduction :



Avec :

- S : le substrat,
- C₀ : la forme oxydée du coenzyme,
- C_r : la forme réduite du coenzyme et
- μ : le coefficient stœchiométrique.

Deux cas peuvent se présenter :

-Lorsque la constante cinétique est élevée donc la réaction enzymatique est rapide, il se produit une réaction complète au voisinage de l'électrode.

- Lorsque la constante cinétique est faible, ils ont remarqué que :

* dans le cas où l'enzyme est dissoute dans la solution, le coenzyme est utilisé en continu d'où diminution du coenzyme.

* dans les deux cas restant (pas d'enzyme en solution), la concentration du coenzyme augmente rapidement dans la solution, par conséquent une diminution de l'intensité du courant.

S. Cosnier [45], décrit le concept et les potentialités d'une procédure électrochimique originale d'immobilisation d'enzymes. Cette méthode en deux étapes consiste en l'adsorption d'un mélange aqueux d'enzyme et de pyrroles amphiphiles sur une surface d'électrode, suivie de l'électropolymérisation des monomères adsorbés. Il présente aussi, des exemples de biocapteurs enzymatiques en phase organique et de connexion électrique d'enzyme immobilisées.

J.P. Magnin et al [46] étudient les capacités de la biomasse de *Thiobacillus ferrooxidans* pour la tolérance aux métaux dans un effluent monométallique, bimétallique ou industriel dans le but de concevoir un procédé bioélectrochimique permettant la production de cette biomasse pour la récupération de métaux en solution.

Ils réalisent un réacteur bioélectrochimique à cathode volumique de grains de carbone qui régénère les ions ferreux, substrat de la bactérie *Thiobacillus ferrooxidans* DSM 583. La concentration protéique, corrélée à la concentration en biomasse, est 6,4 fois plus importante que celle obtenue pour une culture sans régénération lors d'une culture de 55 heures dont 20 heures sous électrolyse.

G. Maini et al [47], étudient la combinaison de deux processus : électrochimique et biologique. Dans le premier l'application directe d'un courant électrique dans le sol par insertion de deux électrodes mène à la génération des ions hydrogènes à l'anode et des ions hydroxyles à la cathode. Cependant, les bactéries du genre *Thiobacillus thiooxidans* interviennent dans la conversion des métaux sous forme de sulfites en sulfates, ces derniers sont solubles donc ils peuvent être transportés à l'intérieur du sol par électromigration et recouvrir la cathode, par conséquent dépollution du sol.

Il semblerait aussi que le courant électrique a un effet positif sur les bactéries car il élimine les inhibiteurs des bactéries.

G. Tresset [43] a fait recours à des membranes sphériques synthétiques telles que les liposomes pour agir comme vecteur de transfert. L'objet à implanter est d'abord encapsulé dans (ou sur) un liposome, puis ce dernier est fusionné avec une cellule. En présence d'un champ électrique, l'objet se polarise et se déplace selon le gradient du champ. Outre leur polarisation, les membranes biologiques réagissent à un champ électrique en formant de minuscules pores qui se referment sitôt la stimulation électrique terminée. Ainsi, lorsque deux membranes de deux cellules distinctes en contact, sont soumises à un champ électrique d'intensité suffisante, les pores de chacune des membranes sont susceptibles de se reconnecter ensemble pour former une seule et unique membrane ; c'est l'électrofusion, qui s'est révélée très utile pour l'hybridation de cellules végétales. La fusion peut servir également à implanter un objet inorganique ou une molécule, au cœur d'une cellule ou bien sur sa surface.

J. Prussacova et al [48], ont élaboré un dispositif afin d'étudier l'action du champ magnétique sur le développement de la mousse *Physcomitrella patens*. Ils ont mis en évidence, la réaction et la réponse de la plante à des champs magnétiques de différentes fréquences.

Au niveau d'une plante, ils ont remarqué que :

- Pour un courant continu (DC) et une fréquence de 16Hz, il y a diminution de la vitesse de croissance des plantes. La structure des plantes est moins développée

comparée au témoin pour une fréquence de 50Hz. Cependant, ils ont trouvé que pour une fréquence de 400Hz, le développement des spores est stimulé.

- L'essai à haute fréquence semble indiquer que deux effets se superposent au niveau de la plante : l'action directe du champ magnétique sur le système biologique d'une part, et l'effet thermique causé par le flux magnétique à 900 Hz d'autre part.

D. Janet [49], a mis au point une technique : l'ionocinèse, elle consiste en l'application de champ électrique régulé. L'ionocinèse exerce sur les tissus vivants une action revitalisante. Placés dans un liquide nutritif des fragments de chair musculaire respirent et dégagent des bulles de gaz carbonique. L'application d'un champ électrique d'ionocinèse accélère considérablement ce dégagement, ce qui met en évidence l'activation de la respiration des cellules. Il en résulte un regain de vitalité. Une plaie se cicatrise plus vite. Une fracture, elle aussi, se ressoude plus vite.

L'ionocinèse exerce en outre une action de nature chimique. En effet, de nombreuses substances se déplacent sous l'effet du champ électrique, ce qui permet aussi bien d'extraire du corps diverses toxines et d'exercer une action épuratrice que d'y introduire de nombreux agents thérapeutiques.

P. Bussières [50], ont étudié l'iontophorèse, qui consiste à faire pénétrer, à travers la peau intacte, une substance médicamenteuse à l'aide d'un courant électrique.

Sous l'action du courant électrique, la dexaméthasone sodium phosphate dissoute conduit à la formation de molécule de dexaméthasone chargée négativement qui pourront donc pénétrer la peau sous l'électrode négative. Il n'y a pas d'absorption du médicament par le système gastro-intestinal.

Cette méthode présente des avantages :

- Contrairement à la voie orale, le médicament pénètre dans un espace précis, permettant théoriquement une plus grande concentration locale dans le tissu.
- Le médicament n'est pas métabolisé par le foie avant de se retrouver dans le tissu. Ainsi, des doses plus faibles sont suffisantes pour le traitement.

A. Bergel *et al* [51], ont étudié la catalyse de la polymérisation des composés phénolés par la peroxydase de « raifort » en présence d'eau oxygénée. Cette méthode est envisagée dans le cadre de la dépollution d'effluents car les polyphénols formés sont insolubles et donc facilement séparables du milieu. Le mécanisme catalytique de polymérisation du phénol est : l'eau oxygénée oxyde la peroxydase (HRP), la forme oxydée est appelée composé I, est réduite en formant deux radicaux phénoxyles qui réagissent sur le phénol et les polyphénols.

L'intérêt du procédé bioélectrochimique réside dans la possibilité de contrôler la concentration de l'eau oxygénée qui, si elle est trop importante, provoque une dénaturation rapide du catalyseur.

Pour être réalisable dans un électrolyseur, la polymérisation doit s'effectuer à un pH alcalin pour lequel les polyphénols formés restent solubles et ne polluent pas l'électrode. La HRP perd son activité catalytique dans ces milieux, c'est pourquoi l'hématine (catalyseur proche de la HRP pour certaines réactions) a été testée dans les mêmes conditions, à pH 11,3. Après une heure d'électrolyse les polyphénols sont précipités par acidification de la solution et séparés par centrifugation. Les meilleurs résultats donnent des taux de transformation de 60% qui démontrent la faisabilité du procédé et prouvent que l'hématine est un catalyseur de la polymérisation du phénol en présence d'eau oxygénée.

M. Bazhal *et al* [4], ont appliqué un champ électrique aux aliments agricoles: c'est l'électroperméabilité. C'est une méthode efficace pour la destruction des membranes, elle facilite l'extraction en augmentant les diamètres des pores.

La valeur optimale du champ électrique dépend de la nature des tissus. Pour les carottes, les pommes de terres, les concombres et les pommes, le champ optimal est entre 200 et 400 V/cm, pour les aubergines, il est entre 500 et 600 V/cm et pour les bananes, il est entre 900 et 1100V/cm.

Q. Luo et al [52], ont testé la faisabilité du couplage courant électrique-biodégradation du phénol, cela aux cours de la phase exponentielle, ils ont constaté qu'un courant électrique de 20mA a un effet positif sur la dégradation du phénol. Un courant supérieur ou inférieur de cette valeur n'a pas d'effet sur la biodégradation.

La modélisation par plan factoriel

VI.1-INTRODUCTION :

La modélisation est une méthode qui consiste à créer des modèles pour concevoir, étudier ou optimiser des objets, des systèmes ou des processus (molécules, composants électroniques, processus industriels, dispositifs, programmes informatiques). Elle utilise l'outil informatique pour substituer ou ajouter à l'expérimentation et au prototypage réels une analyse par modèles et simulation [53].

Autre définition d'un modèle, c'est une représentation plus au moins approchée d'un processus. Il existe plusieurs types, mais lorsque l'ensemble du processus soumis à un examen est décrit de manière simplifiée au moyen d'un ensemble d'équation mathématique, on dit alors qu'on a affaire à un *Modèle Mathématique* [54].

Le modèle permet donc de faire des prévisions et de formuler des recommandations [54].

VI.2-PLANIFICATION D'EXPERIENCES :

Les deux grandes étapes qui encadrent l'expérimentation sont, en amont : la planification des expériences, et en aval : l'analyse des données.

La planification nécessite impérativement que puisse être établie par l'expérimentateur une relation de cause à effet entre certains paramètres du phénomène (appelés facteurs), qui sont supposés influencer le comportement du phénomène, et d'autre (appelés réponses) qui caractérise le résultat du phénomène [54].

La modélisation mathématique consiste à trouver une fonction f telle que [55]:

$$Y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_n)$$

Avec :

Y : la réponse

$X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$: les facteurs.

Dans notre cas, X_1 représente la température de prétraitement du grignon d'olive.

X_2 représente le rapport masse en gramme du grignon d'olive/ masse en gramme de la soude.

X_3 représente le pH du mélange réactionnel.

X_4 représente la température du mélange réactionnel.

X_5 représente le rapport masse en gramme de l'enzyme/ masse en gramme du grignon d'olive.

X_6 représente le champ électrique.

Le schéma de la boîte noire (Figure N°6) représente très bien cette situation, dans laquelle les entrées sont les facteurs et les résultats sont les réponses.

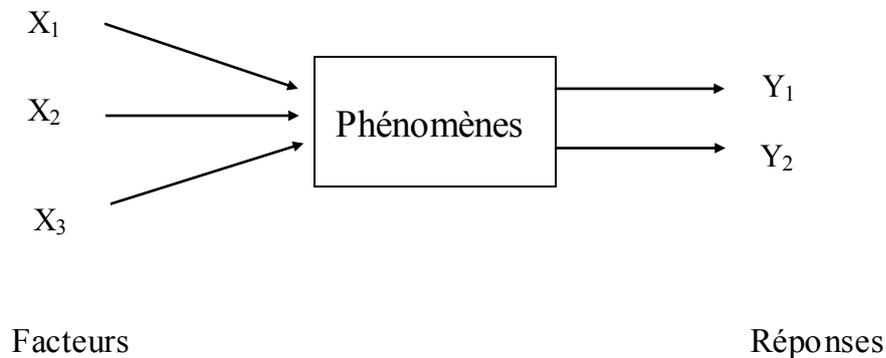


Figure N° 6 : schéma de la boîte noire [54]

VI.3-DEFINITION :

Un plan d'expérience (Design of Experiments ou DOE) est une méthode stratégique optimale permettant de prédire avec le maximum de précision une réponse à partir d'un nombre minimal d'essais et en utilisant un modèle postulé. Les résultats

de ces simulations peuvent être exploités de différentes manières pour en extraire des informations sur les influences des paramètres du problème [56].

L'ensemble des conditions expérimentales imposées aux facteurs est appelé le *plan d'expérience*.

VI.4-NOTIONS SUR LES PLANS D'EXPERIENCES :

On se sert la plupart du temps des plans d'expériences pour construire un polynôme qui modélise la performance ciblée d'un système. Ces termes seront les paramètres ou (X_i) du problème, et ses coefficients refléteront leur importance spécifique sur la performance ciblée. On choisira le plan en fonction du polynôme qui correspond le mieux au processus que l'on souhaite modéliser. On peut aussi exploiter un plan pour définir seulement des tendances sans se préoccuper de la construction d'un polynôme. Dans cette discipline, les paramètres sont nommés "facteurs" de dessin ou de bruit [56].

VI.4.1- Avantages des plans d'expériences :

La méthode des plans d'expériences permet de tirer d'un nombre d'essais donné un maximum d'informations crédibles concernant l'influence des facteurs. Elle permet notamment de maximiser le ratio informations recueillies/ nombre d'essai réalisés. Elle offre ainsi la possibilité de quantifier et de hiérarchiser les effets d'un grand nombre de facteurs du système étudié, et cela avec un nombre d'essais relativement faibles, c'est-à-dire dans le minimum de temps et de coûts [57].

VI.4.2- Domaines d'application des plans d'expériences :

Les plans d'expériences ont habituellement été appliqués dans la recherche et le développement de nouveaux produits ou procédés.

Pour le domaine industriel, les plans d'expériences peuvent s'appliquer à tous les stades de la vie d'un produit, que ce soit pour optimiser les performances du produit ou du procédé de fabrication, ou pour résoudre des problèmes de fabrication [57]. Le tableau ci après résume les principales activités pour lesquelles les plans d'expériences peuvent être appliqués avec profit [57].

Tableau N°4 : principales activités d'application des plans d'expériences [54]

<i>Principale activités concernées</i>
• Etudes de marketing
• Choix des principes technologiques et des matériaux
• Définition des produits ou des procédés (Détermination des performances nominales, tolérances)
• Amélioration des produit ou de procédé
• Essais de qualification (fiabilité, environnement)
• Résolution des problèmes qualité en fabrication

VI.4.3-Différents modèles [56] :

a) Modèle linéaire sans interactions :

$$Y(X) = b_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i \quad (7)$$

Ce modèle nécessite n+1 simulations pour être défini. Il est souvent utilisé pour faire du "factor screening", c'est à dire identifier par une approche de type analyse de sensibilité les facteurs non critiques pour éventuellement les éliminer du processus d'optimisation qu'ils alourdissent inutilement.

b) Modèle linéaire avec toutes les interactions :

$$Y(X) = b_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum c_{ij} X_i X_j + \sum h_{ijk} X_i X_j + \dots + \sum p_{ijk\dots n} X_i X_j X_k \dots X_n \quad (8)$$

Ce modèle nécessite au moins 2n simulations pour être défini. Bien sûr, si l'on estime que l'un des termes n'est pas intéressant, on ne le fera pas apparaître dans le polynôme et l'on s'économisera ainsi une simulation. C'est généralement le cas des interactions d'ordre supérieur à 2 qui ont très rarement un rôle significatif à jouer d'un point de vue physique.

c) Modèle linéaire avec interactions d'ordre 1:

$$Y(X) = b_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum c_{ij} X_i X_j \quad (9)$$

Ce modèle nécessite au moins $n+1+n(n-1)/2$ simulations pour fixer ses coefficients. Il est utilisé notamment lorsque l'on cherche la direction d'un optimum.

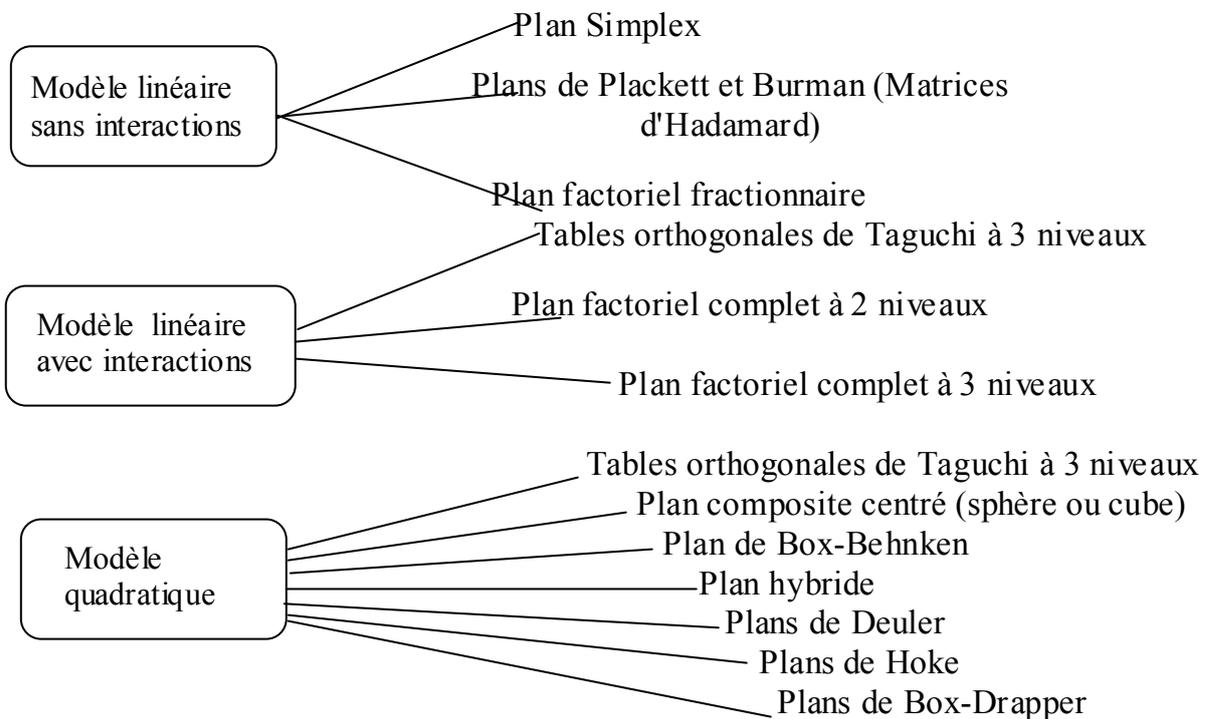
d) *Modèle du second degré :*

$$Y(X) = b_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum c_{ij} X_i X_j + \sum e_{ii} X_i^2 \tag{10}$$

C'est le modèle factoriel auquel on a ajouté les termes quadratiques, il nécessite donc au moins $2n+1+n(n-1)/2$ simulations pour être complètement défini. Il est utilisé lorsque l'on veut localiser l'optimum : dans ce cas, on fait l'hypothèse qu'il se trouve dans le domaine de validité du polynôme, ou les facteurs présentent un optimum.

VI.4.4-Différents plans d'expériences [56]:

On choisit un polynôme et un plan d'expérience en fonction du problème à résoudre. Il en existe de nombreux plans d'expérience.



VI.4.4.1- Matrices d’Hadamard :

Les matrices d’Hadamard ou Plackett et Burman sont des matrices d’expériences dont le niveaux de chaque facteur ne prennent que deux états distincts, notés généralement -1 et +1 (ou même – et+). Le nombre d’expériences N qui les compose est toujours un multiple de 4 [54].

Les matrices d’Hadamard constituent l’une des méthodes les plus utilisées pour rechercher le facteurs influents dans un domaine expérimental donné ; c’est le criblage. Elles permettent de calculer les « poids » relatifs des facteurs étudiés sur la réponse mesurée. Cependant, bien que permettant d’obtenir des résultats quantitatifs, les matrices d’Hadamard doivent plutôt être utilisées pour séparer le facteur en plusieurs classes suivant leur influence sur la réponse. Aussi seront distingués des facteurs important, moyens ou négligeables.

Les matrices d’Hadamard permettent de calculer le effets de k facteurs, avec $k \leq N-1$ ou N est le nombre d’expériences [54].

Construction de la matrice d’Hadamard :

Le tableau N°5 indique la ligne de départ en fonction du nombre k de facteurs à étudier et le nombre N d’expériences obtenues.

Tableau N° 5: Première lignes de la matrice d’Hadamard [54]

Nombre de facteurs	Nombre d’expériences	Ligne de départ
$k \leq 3$	4	++-
$4 \leq k \leq 7$	8	+++--+
$8 \leq k \leq 11$	12	++-+++--+
$12 \leq k \leq 15$	16	++++-+---+
$16 \leq k \leq 19$	20	+---++++-+-+---
$20 \leq k \leq 23$	24	+++++--+---+---

Algorithme de construction de la matrice d'Hadamard:

En partant de la ligne sélectionnée à partir tableau précédent. L'élaboration de la matrice d'Hadamard se fait par application de l'algorithme suivant :

- Ecrire la première ligne
- La permuter N-2 fois a droite, avec N le nombre d'expérience à réaliser.
- Supprimer les deux dernières colonnes.
- Ajouter une ligne de signe (-) [54].

VI.4.4.2- Matrices factorielle complète 2^k :

Une matrice factorielle complète, notée 2^k , est obtenue en formant toutes les combinaisons de deux niveaux (ou modalité, ou états, codés arbitrairement -1 et +1) de chacun des k facteurs [54].

Ces matrices permettent de calculer l'effet moyen, les effets principaux des facteurs, leurs interactions deux à deux, trois à trois, etc. jusqu'à l'interaction générale entre les k facteurs [54].

Construction de la matrice factorielle complète:

La matrice d'expérience factorielle complète ici, notée 2^6 , est formée des 32 combinaisons décrites dans le tableau N°6

Tableau N° 6: Matrice d'expérience factorielle 2^6

Expérience	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Expérience	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
1	-	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	+	-
2	+	-	-	-	-	-	18	+	-	-	-	+	-
3	-	+	-	-	-	-	19	-	+	-	-	+	-
4	+	+	-	-	-	-	20	+	+	-	-	+	-
5	-	-	+	-	-	-	21	-	-	+	-	+	-
6	+	-	+	-	-	-	22	+	-	+	-	+	-
7	-	+	+	-	-	-	23	-	+	+	-	+	-
8	+	+	+	-	-	-	24	+	+	+	-	+	-

9	-	-	-	+	-	-	25	-	-	-	+	+	-
10	+	-	-	+	-	-	26	+	-	-	+	+	-
11	-	+	-	+	-	-	27	-	+	-	+	+	-
12	+	+	-	+	-	-	28	+	+	-	+	+	-
13	-	-	+	+	-	-	29	-	-	+	+	+	-
14	+	-	+	+	-	-	30	+	-	+	+	+	-
15	-	+	+	+	-	-	31	-	+	+	+	+	-
16	+	+	+	+	-	-	32	+	+	+	+	+	-

VI.5- DEFINITION DES EFFETS PRINCIPAUX ET DES INTERACTIONS :

VI.5.1- L'effet principal :

L'effet principal appelé aussi l'effet simple et défini comme la variation de la réponse provoquée par un changement de niveau de ce facteur. Il caractérise l'influence individuelle de ce facteur, et se calcule en faisant la moyenne entre les valeurs obtenues par la différence entre la moyenne des réponses et les valeurs de la réponse quand la variable associée est au niveau (+1) ou (-1) [54].

VI.5.2- Les interactions :

Elles correspondent à l'effet simultané de deux ou plusieurs facteurs [54].

VI.5.2.a- Interaction deux à deux :

On dit qu'il y a interaction entre les deux variables X_1 et X_2 si l'effet moyen de l'un n'est pas le même suivant que l'on se place au niveau (-1) ou (+1) de l'autre.

Dans notre étude les interactions deux à deux à étudier seront : X_{12} , X_{13} , X_{14} , X_{15} , X_{16} , X_{23} , X_{24} , X_{25} , X_{26} , X_{35} , X_{36} , X_{45} , X_{46} , X_{56} ou X_{12} désigne l'interaction entre les variables X_1 et X_2 , et donc l'interaction entre la température de prétraitement du grignon d'olive et le rapport g de grignon d'olive / g de NaOH. De même pour l'ensemble des interactions restantes.

Ces interactions se calculent en faisant d'abord leurs produits, puis par la différence entre la moyenne arithmétique des valeurs de la réponse quand la variable

associée est au niveau (+1) et la moyenne arithmétique des valeurs de la réponse quand la variable associée est au niveau (-1) [54,55].

VI.5.2.b- Interaction de plusieurs facteurs :

Ce type d'interaction se traduit par les différentes combinaisons des variables associées, dans notre cas les interactions seront les suivantes :

$X_{123}, X_{124}, X_{125}, X_{126}, X_{134}, X_{135}, X_{136}, X_{145}, X_{146}, X_{156}, X_{123456}$.

Leur détermination revient à faire leurs produits, puis on procède de la même façon que pour la détermination des interactions deux à deux.

Dans notre cas, X_{123} désigne l'interaction mutuelle entre les variables X_1, X_2, X_3 , et donc l'interaction mutuelle entre la température de prétraitement du grignon d'olive, le rapport g de grignon d'olive / g de NaOH et le pH de mélange réactionnel.

VI.6- Validation du modèle :

Il s'agit de vérifier si le modèle estimé explique correctement les variations de la réponse observée. Le modèle sera considéré comme adéquat (approprié) si pour une combinaison donnée, l'écart entre la réponse moyenne observée et la réponse moyenne prédite par le modèle est acceptable [58].

L'équation de la régression est obtenue par application du programme Microsoft Excel ® et du logiciel approprié connu sous le nom de S.P.S.S, qui nous a permis de mener cette application à terme.

a) Analyse de la corrélation :

Le coefficient de corrélation R^2 , nous renseignera sur la validité du modèle. Plus ce coefficient est loin de l'unité plus ils sera considéré médiocre, et donc le modèle qui le fournit est moins représentatif [59].

b) Analyse des résidus :

Les résidus sont les différences entre la réalité et la représentation. Il y a donc n résidus qu'on obtient par différence entre les valeurs Y réellement observées et celles qui sont fournies par l'équation de la régression [59], avec n étant le nombre d'essais.

Une étude de la distribution de ces résidus par rapport à l'axe des abscisses reflète plus au moins la validité du modèle. En effet, plus les résidus sont distribués de part et d'autre par rapport à l'axe des abscisses des graphes qui les représentent plus le modèle est bon.

c) Analyse de la régression :

L'examen des graphes des régressions accompagnant le modèle postulé permettra de voir plus clairement la localisation de chaque point expérimentale par rapport à sa valeur déterminée à partir de la régression, et donc du modèle, le tout sur le même graphe[59].

d) Seuil de confiance :

Les résultats qui seront fournis après application de la régression linéaire seront justes à 95 % 0,05 étant le seuil de confiance généralement adopté en génie des procédés [59].

I- INTRODUCTION :

L'électricité en tant que source d'énergie ou mode directe de traitement, se prête à des associations avec d'autres techniques nouvelles et a donné de bons résultats en laboratoire et cela en particulier pour les techniques membranaires [60].

Notre travail consistera, en la conception d'une nouvelle technique de couplage hydrolyse enzymatique - champ électrique.

Dans un premier temps, nous déterminerons les caractéristiques du substrat utilisé ainsi que les produits et matériels utilisés tout au long de nos manipulations.

Nous testerons la faisabilité du couplage hydrolyse enzymatique/champ électrique.

Nous optimisons le champ électrique dans la gamme de valeurs allant de 0,86 à 5,71 V/m.

II- CARACTERISTIQUES DES PRODUITS UTILISES :

Avant d'entamer l'étude de la faisabilité du processus, il est nécessaire de déterminer les caractéristiques du grignon d'olive ainsi que l'enzyme utilisée (cellulase).

II.1-Caractérisation et prétraitement des grignons d'olive :

Le grignon d'olive a été prélevé au niveau de la région de Tadmait, durant la campagne oléicole 1995-1998. L'échantillon prélevé est constitué de pulpes et de fragments de noyaux. Il a été conditionné dans des sacs en plastique.

II.1.1-Préparation du substrat :

Le substrat utilisé subit deux prétraitements :

- Un prétraitement physique.
- Un prétraitement chimique.

Etude expérimentale

a- prétraitement physique :

Il consiste à sécher l'échantillon à 70°C puis à le broyer à l'aide d'un broyeur à mâchoires type TEK © et ensuite à le tamiser.

La poudre obtenue présente une granulométrie moyenne de 460 µm.

b- prétraitement chimique :

Il consiste à mettre l'échantillon broyé dans une solution de NaOH (R= 20 g d'échantillon / g de NaOH) et cela pendant une heure à 100°C, sous agitation moyenne [3]. L'échantillon récupéré est lavé à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage devienne neutre. Il est ensuite séché à l'étuve à 70°C.

II.1.2- Détermination des caractéristiques chimiques des grignons d'olive :

La matière sèche, les cendres totales, la matière grasse et l'azote total sont déterminés par les méthodes d'analyses classiques [14] :

a- L'humidité :

C'est le rapport exprimé en pourcentage du poids de l'eau contenue dans un matériau, au poids du solide.

L'échantillon de masse M_0 est séché dans une étuve à température de 110°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante M_1 . L'humidité est calculée par la relation :

$$H = (M_0 - M_1) / M_0 \quad (11)$$

b- Matière sèche :

C'est le résidu obtenu après séchage à 110°C. La relation est :

$$MS = 100 - H \quad (12)$$

c- Cendres totales :

Elle sont définies comme étant le résidu obtenu après calcination à 550°C dans un four à moufle. Le taux de cendres est défini par :

$$\% \text{ Cendres} = m / m_0 \times 100 \quad (13)$$

Etude expérimentale

Avec :

m_0 : masse de grignon d'olive (on prend une masse égale à 1 g).

m : masse de cendres pesée après calcination.

Les éléments minéraux sont déterminés par photométrie de flamme.

d- Matière grasse :

La teneur en matières grasses est déterminée par pesée après extraction à l'éther de pétrole et séchage à l'étuve durant 48 heures (voir annexe).

e- Matières azotées totales :

La teneur en matières azotées totales est déterminée par la méthode de Kejdahl (voir annexe).

Le taux de protéines est obtenu en multipliant la teneur en azote total trouvé par le facteur conventionnel 6,25.

f- Cellulose brute :

La teneur en cellulose brute est déterminée par la méthode de **Weende** (voir annexe).

Dans cette méthode, les matières cellulosiques correspondent au résidu organique insoluble obtenu après attaque acide (H_2SO_4 0,26 N) et alcaline (NaOH 0,31 N) du substrat.

g -Composés pariétaux :

La teneur en composés pariétaux (cellulose, hémicellulose et la lignine) est déterminée par la méthode de Van Soest [61] (voir annexe).

Cette technique permet d'isoler successivement trois résidus à savoir ;

- * NDF (Neutral Detergent Fibber) qui constitue l'essentiel de la paroi végétale.
- * ADF (Acid Detergent Fibber) qui correspond à la ligno-cellulose.
- * ADL (Acid Detergent Lignin) qui correspond à la lignine.

II.2- Caractéristiques de l'enzyme :

L'enzyme utilisée est une enzyme cellulolytique : sous forme de poudre, purifiée et fabriquée par la firme SIGMA©. C'est une cellulase d'origine fongique (*Trichoderma Reesei*) dont l'activité cellulolytique est de 10,2 unités/mg (Condition CMC pH=5, T=37°C).

II.3-DISPOSITIF EXPERIMENTAL :

***Essai sans application d'un potentiel :**

L'hydrolyse enzymatique est effectuée dans un réacteur discontinu (Figure N°7), dont le volume réactionnel est de 100 ml.

Il est composé :

- Un thermocouple pour pouvoir régler la température.
- Une plaque chauffante avec agitation magnétique.
- Un bain-marie.
- Becher.

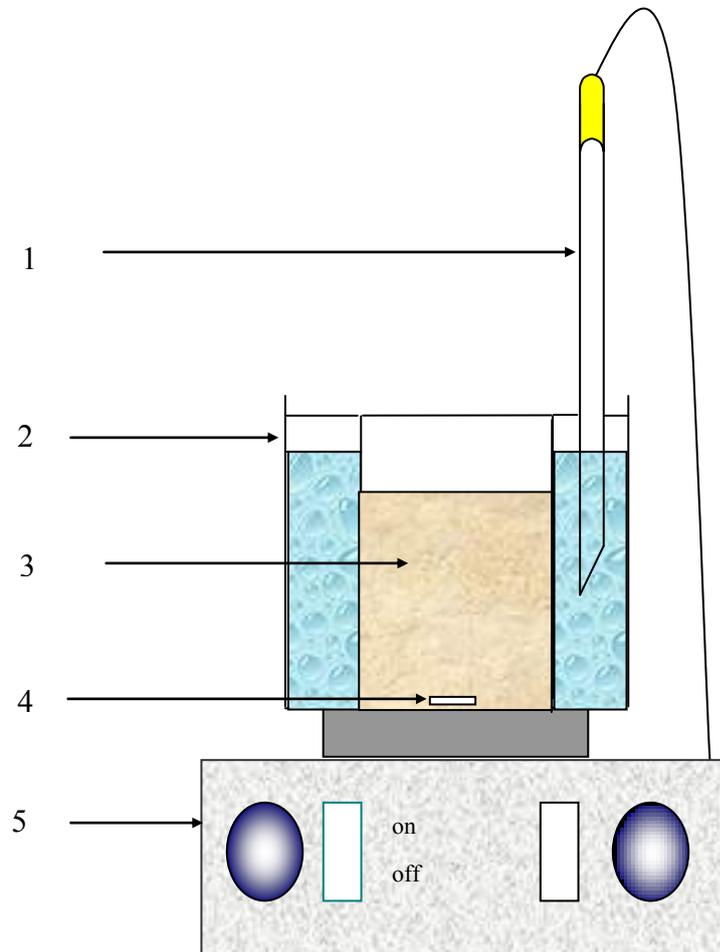


Figure N^o7 : schéma du bioréacteur.

- 1 : thermocouple.
- 2 : bain marie.
- 3 : le mélange réactionnel.
- 4 : barreau magnétique.
- 5 : plaque chauffante + agitateur.

*** Essai avec application d'un potentiel électrique :**

Le même dispositif expérimental est utilisé, avec l'ajout d'un générateur, deux électrodes en inox, des fils électriques et un millivoltmètre.

Le dispositif est représenté sur la Figure N°8

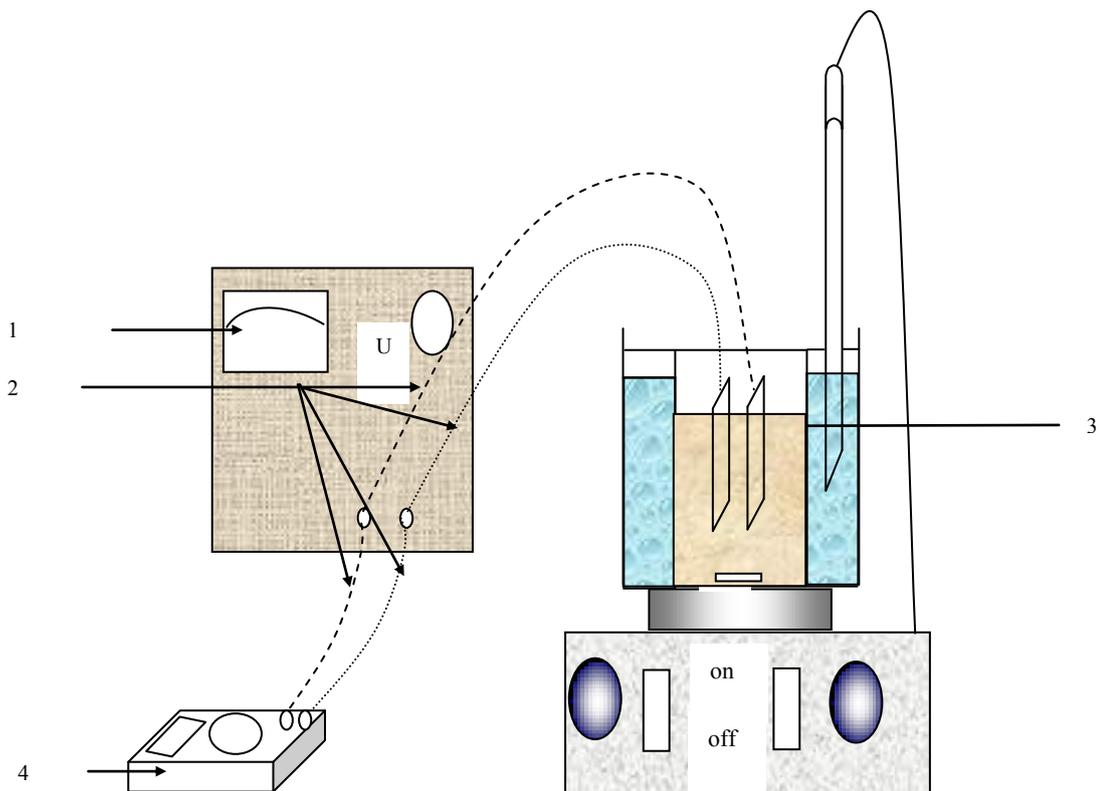


Figure N°8 : Schéma du bioréacteur couplé à un générateur.

- 1 : générateur.
- 2 : fils électriques.
- 3 : électrodes (plaques en inox).
- 4 : millivoltmètre

II.4- MATERIEL ET METHODES :

Les produits ainsi que le matériel utilisés aux cours de nos manipulations sont donnés en annexe.

II.5- Calcul du rendement d'hydrolyse :

Le rendement d'hydrolyse est donné par la relation suivante :

$$R = \frac{C_s}{C_{cellulose}} * 100 \quad (14)$$

Avec :

C_s : la concentration des sucres réducteurs produits.

C_{cellulose} : la teneur en cellulose dans le milieu à t=0.

I- CARACTERISTIQUES CHIMIQUE DU GRIGNON :

I.1- Caractéristiques chimiques du grignon d'olive non prétraité :

Au cours de cette étude, nous avons déterminé les principales caractéristiques chimiques du grignon d'olive non prétraité à la soude. Ces caractéristiques sont présentées sur le Tableau N°7.

Tableau N°7 : Caractéristiques chimique du grignon d'olive non prétraité

Composés	Teneurs (en% poids/poids) de la MS	Teneurs (en% poids/poids) de la MS relevées par la bibliographie (Cités par [14])
Matière sèche MS	89,11	75-90
Matière grasse MG	11,73	8-13
Cellulose brute	46,2	35-50
Hémicellulose	23,83	/
Lignine	19,89	/
Matières azotées totales	7,32	5-10
Cendres totales	4,78	3-5

Les résultats des analyses effectuées sur le grignon d'olive de Tadmait sont globalement conformes à ceux rapportées par la littérature.

Par exemple, la teneur en matière grasse de 11,73% de la MS est très proche à celle rapportées par Nefzaoui [14], qui est entre 8 et 13% de la MS.

La teneur en matières azotées totale que nous avons trouvée est de 7,32% de la MS, valeur comprise dans la fourchette (5-10 % de la MS) généralement citée par la bibliographie [14].

Il est à noter la valeur importante de la fraction carbohydrates (cellulose) relevée. C'est cette partie du complexe lignocellulosique qui va faire l'objet de l'hydrolyse enzymatique, en vue de la production de sucres.

Il est à relever l'importante fraction de la lignine (19,89% de la MS) qui va constituer ainsi, un obstacle majeur pour l'hydrolyse enzymatique d'où la nécessité d'un prétraitement chimique.

Les teneurs moyennes en éléments minéraux : K^+ et Na^+ sont regroupées dans le Tableau N°8.

Tableau N°8 : Les teneurs moyennes en éléments minéraux

Eléments	Teneurs en % de la matière sèche (poids/poids)
K^+	0,1
Na^+	0,2

D'après ce tableau, on remarque que les teneurs en éléments minéraux mesurés sont de même ordre que celles citées par d'autres auteurs cités par Nefzaoui [14].

I.2- Caractéristiques chimiques du grignon d'olive prétraité à la soude :

Du fait des teneurs en lignine mesurées, nous sommes amenés à procéder à l'étape du prétraitement du grignon à la soude.

Les résultats de l'analyse chimique du grignon d'olive traité à la soude caustique sont donnés dans le Tableau N°9 (page suivante).

D'après les résultats obtenus, nous constatons que le traitement du grignon d'olive à la soude fait diminuer les teneurs en hémicellulose et en lignine de 71% et de 76% respectivement.

Les diminutions des teneurs en cellulose et en matières azotées totales et en matières grasses après traitement sont pratiquement faibles.

Ces résultats corroborent ceux rapportés par **Aguilera** J.E [62] et **Moss** A.R [63].

Nous tenons à relever que **Susumu et al** [64], ont obtenu de meilleurs taux en appliquant un traitement à la vapeur.

Tableau N°9 : Caractéristiques chimiques du grignon d'olive prétraité

Composés	Teneurs en % de la matière sèche (poids/poids)
Matière sèche	84,22
Matière grasse	8,94
Cellulose	42,53
Hémicellulose	0,17
Lignine	0,15
Matières azotées totales	6,67
Cendres totales	10,28

II- HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GRIGNONS D'OLIVE :

II.1-Essai de faisabilité du couplage bioréacteur/ champ électrique :

L'essai a pour but de voir la faisabilité de l'application d'un champ électrique sur l'action des enzymes.

Pour ce faire, nous avons soumis le grignon à une hydrolyse enzymatique dans deux séries triplicatas ;

La première série, la réaction d'hydrolyse du substrat traité ait lieu en présence d'un champ électrique de valeur de 2,57 V/m,

Et la deuxième série, nous avons soumis le substrat au même champ électrique c'est à dire 2,57V/m, mais cette fois, le substrat est non prétraité.

Nous rappelons que l'enzyme utilisée *Trichoderma reesei* est d'origine commerciale (Sigma, France). L'activité cellulolytique est de 10,2 unités/mg (Conditions CMC pH=5, T°=37°C).

Et nous comparons les résultats à ceux de l'hydrolyse enzymatique d'un substrat traité sans application du champ électrique.

Notre échantillon est prétraité à la soude, nous travaillons aux conditions optimales préalablement établies (T°= 50°C, pH=5, En/S=0,1g d'enzyme /g d'échantillon) [3].

a- Influence du champ électrique sur un grignon traité :

Les concentrations des sucres réducteurs sont déterminées en utilisant l'acide dinitrosalicylique (DNS) [65] (voir annexe).

Les résultats obtenus nous ont permis de porter l'évolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps d'hydrolyse.

L'évolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps pour les deux cas est illustrée par la Figure N°9.

De même, nous avons calculé les différents rendements en cours d'hydrolyse dans les deux cas, et nous les avons portés sur la figure N°10 et ce en fonction du temps d'hydrolyse.

Nous rappelons que c'est les valeurs moyennes qui sont présentées sur les courbes N° 9 et 10, l'écart type dans tous les cas est inférieur à 1%.

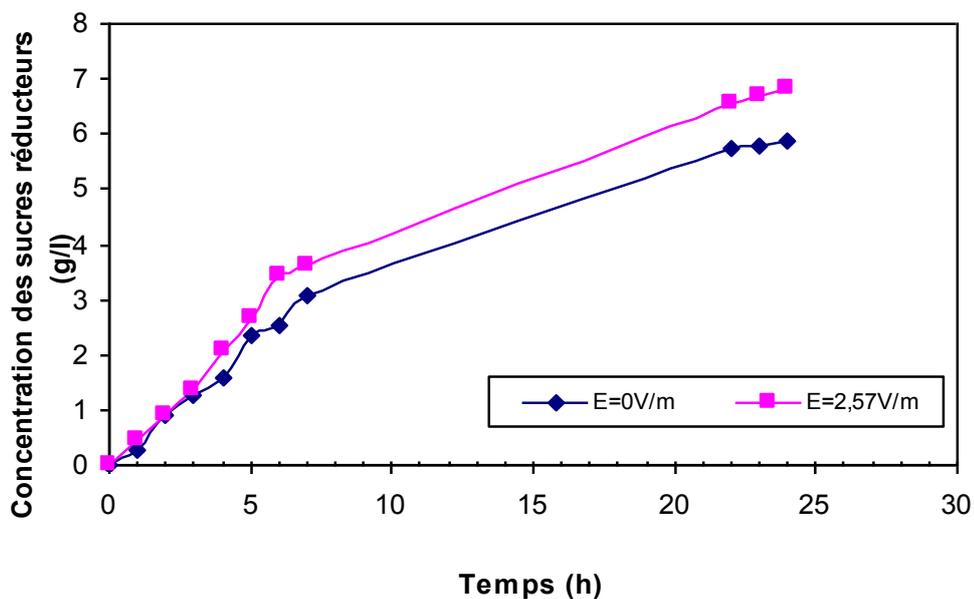


Figure N°9 : Evolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps. ($T^{\circ}= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $E_n/S=0,1$)

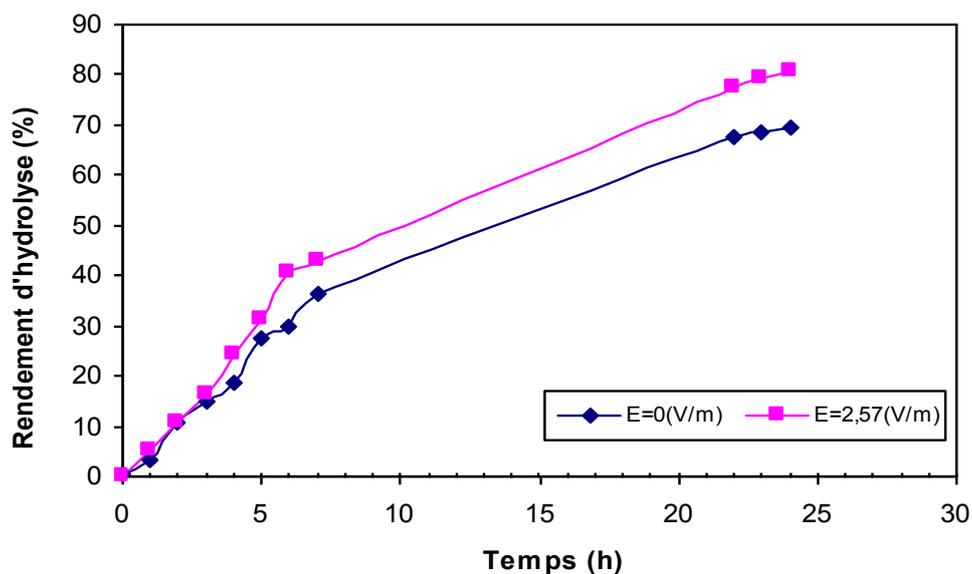


Figure N°10 : Evolution du rendement d'hydrolyse en fonction du temps. ($T^{\circ}= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $E_n/S=0,1$)

En comparant les deux cas : hydrolyse enzymatique du grignon d'olive traité à la soude, couplée à un champ électrique et hydrolyse enzymatique du grignon traité à la soude sans champ électrique, nous constatons qu'au début de l'hydrolyse enzymatique (les trois premières heures), le taux des sucres réducteurs est sensiblement le même pour les deux cas.

Au-delà, les deux profils commencent à se distancier et se distinguer l'un de l'autre au cours de temps d'hydrolyse, ou l'influence du champ électrique se dessine : la quantité des sucres réducteurs obtenue est bien plus importante dans le cas où l'hydrolyse enzymatique est couplée à l'application d'un champ électrique.

Le rendement au bout de 24 heures de réaction, est amélioré de 16% dans le cas d'application du champ électrique, d'où la réponse apportée à la question quant à l'influence positive de l'application du champ électrique sur l'hydrolyse enzymatique du grignon d'olive.

b- Influence du prétraitement du grignon à la soude en présence du champ électrique :

Les évolutions de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps d'hydrolyse d'un grignon traité ou non traité, soumis à un champ électrique est représentée sur la Figure N° 11

De même, nous avons calculé les rendements d'hydrolyse respectifs en fonction du temps pour les deux cas et nous les avons portés sur figure N°12.

Le taux d'hydrolyse enzymatique du substrat traité et non traité à la soude avec application d'un champ électrique (voir la figure N°12) sont de 80,5% et de 35% respectivement et ce au bout de 24 heures d'hydrolyse.

De même, nous constatons que les rendements obtenus dans les deux cas, nous laisse dire que l'étape du couplage du champ électrique à l'hydrolyse ne compense pas l'étape du prétraitement chimique.

Certes l'application du champ électrique dans le cas du grignon non prétraité améliore d'un taux sensiblement remarquable, mais on est loin des taux obtenus avec le prétraitement préalable à la soude.

Nous pouvons conclure qu'il serait nécessaire de prétraiter chimiquement avec la soude le grignon d'olive dans tout les cas de figure.

De ces résultats préliminaires prometteurs (quant à l'efficacité du couplage champ électrique – hydrolyse enzymatique), nous nous attellerons dans les séries de manipulations suivantes d'optimiser les conditions opératoires de l'hydrolyse enzymatique et ce en présence du champ électrique.

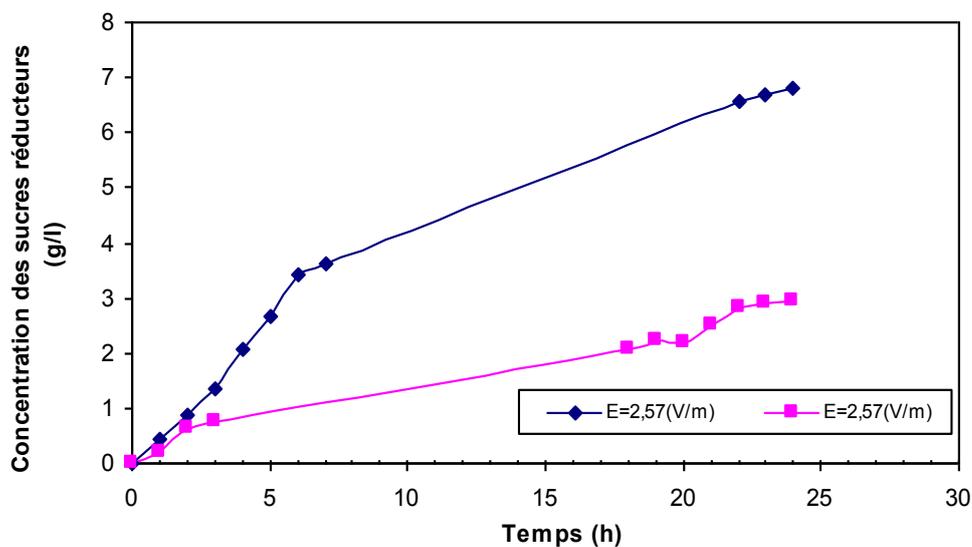


Figure N°11 : Evolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps. ($T^0 = 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $E_n/S=0,1$)

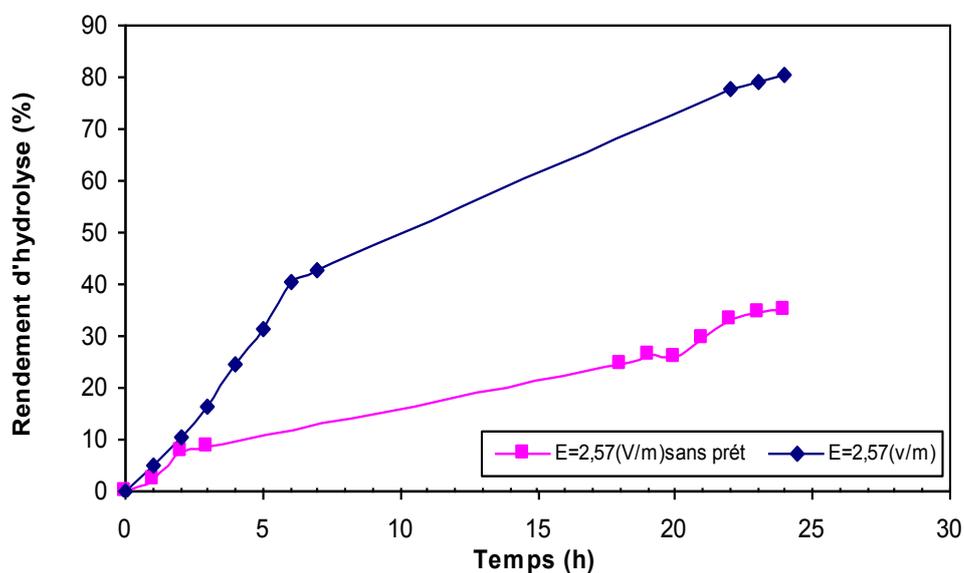


Figure N°12 : Evolution du rendement d'hydrolyse en fonction du temps. ($T^0 = 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $E_n/S=0,1$)

III- HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU GRIGNON DANS UN REACTEUR COUPLE A UN CHAMP ELECTRIQUE :

III.1-Optimisation du potentiel électrique :

Nous déterminons la valeur optimale du champ électrique à appliquer lors de l'hydrolyse enzymatique afin de maximiser le rendement d'hydrolyse aux conditions optimisées suivantes : $T^{\circ}= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $E_n/S=0,1$ [3] préalablement déterminées.

Pour cela, nous avons choisi les valeurs du champ électrique suivantes : 0,86V/m, 1,14 V/m, 1,43 V/m, 2,57V/m, 4,28V/m, 5,71 V/m.

Les courbes donnant l'évolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps pour différentes valeurs du champ électrique sont représentées sur la figure N°13.

La représentation des rendements de saccharification en fonction de différents champs électrique est donnée sur la Figure N°14.

Les Figures N°13 et 14 nous révèlent que les plus fortes concentrations en sucres réducteurs sont obtenus pour une fourchette des valeurs allant de $E=1,14\text{V/m}$ à $E=1,43\text{V/m}$.

De plus, la représentation des rendements de saccharification et l'amélioration du rendement par rapport à une hydrolyse sans application du champ électrique en fonction de la valeur de E (V/m) (Figures N°15.a et 15 .b) nous permet de constater que des améliorations allant de 30 à 35 % sont apportées par l'action du champ électrique en le comparant à une hydrolyse en absence de champ électrique.

Nous pouvons considérer ces résultats comme hautement intéressants du fait que les valeurs du champ électrique appliquées demeurent très basses donc très peu susceptibles d'être énergétivores, ce qui rend le procédé très prometteur.

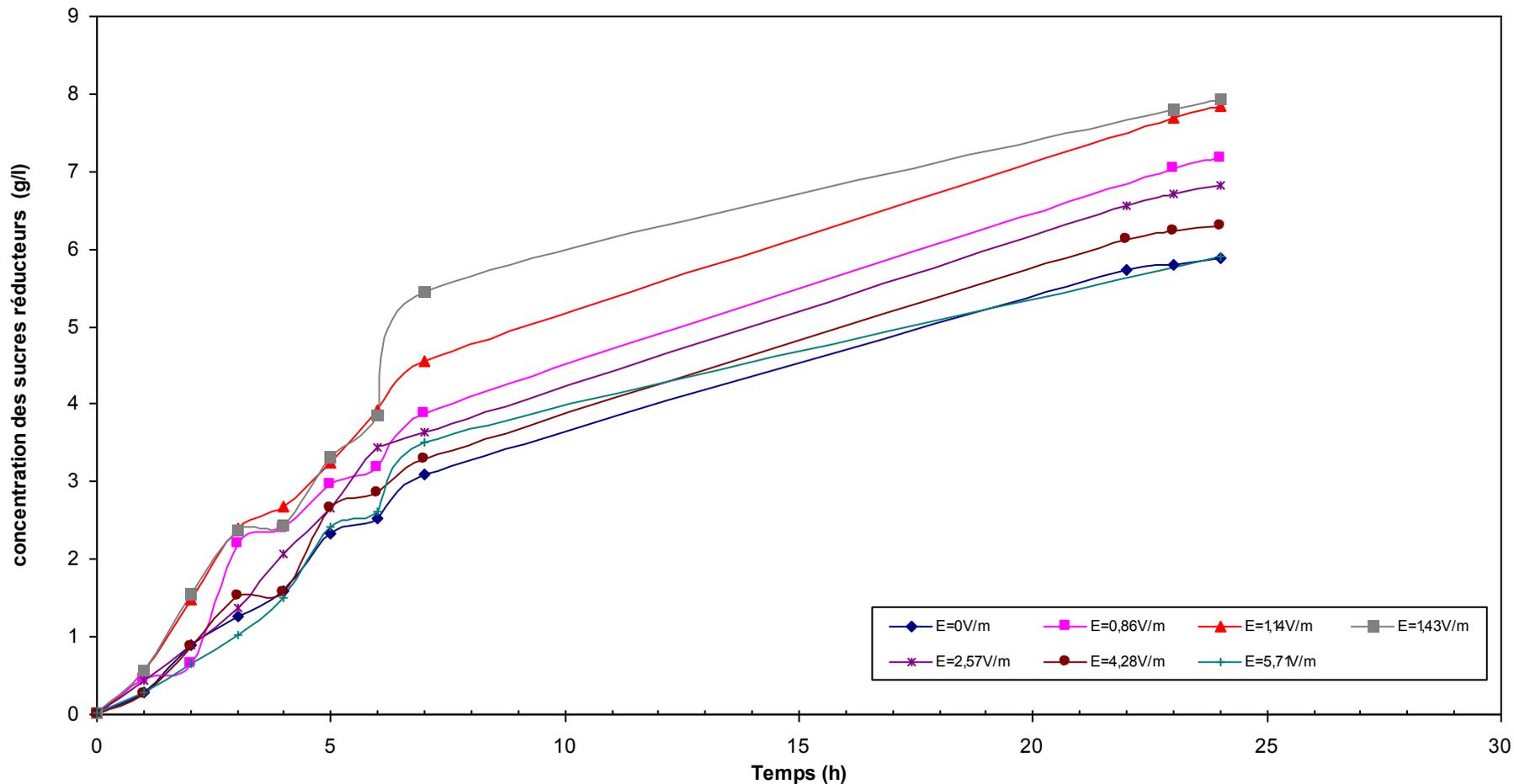


Figure N °13 : Evolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps pour différentes valeurs du champ électrique. ($T^0= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $E_n/S=0,1$)

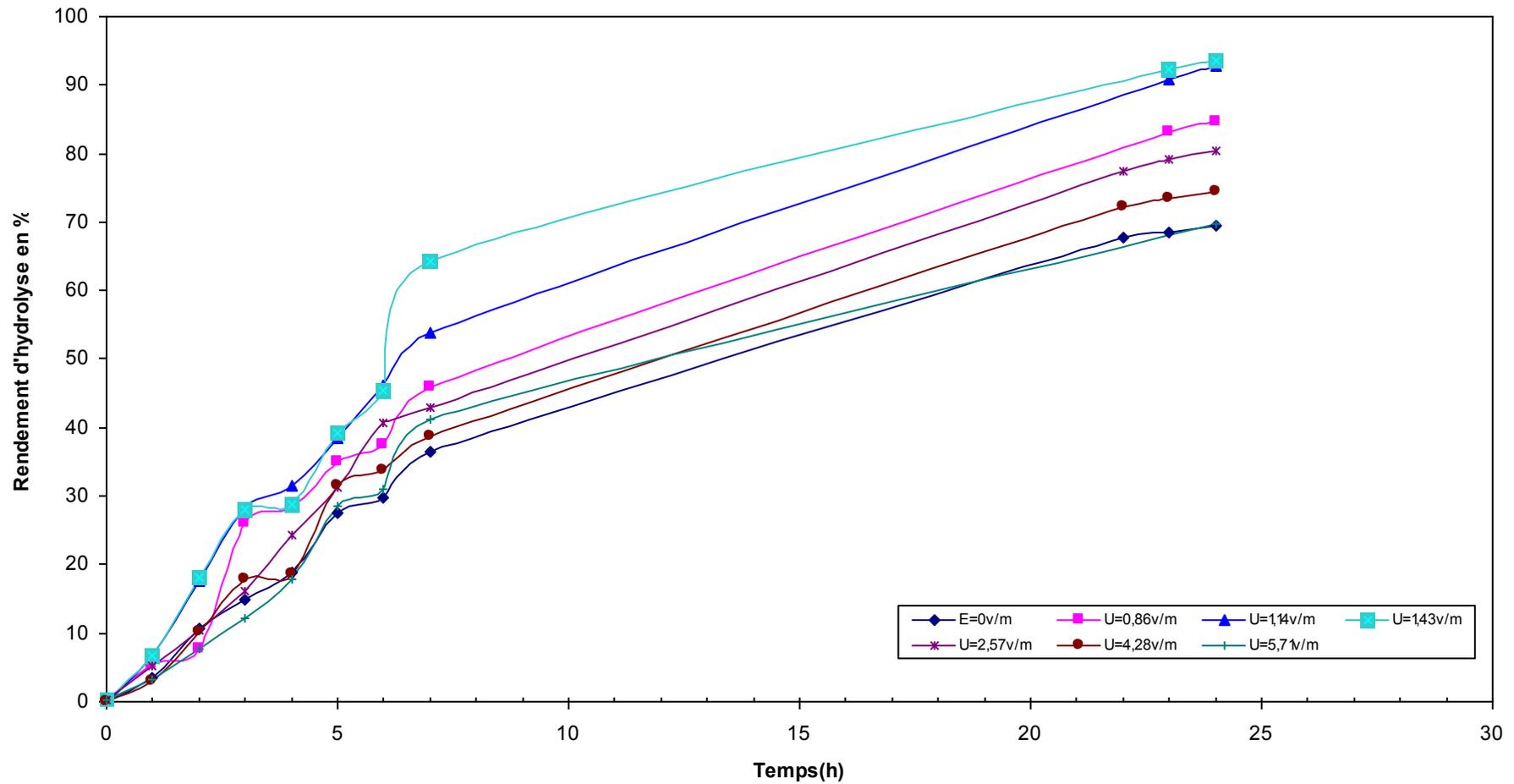


Figure N°14 : Evolution du rendement d'hydrolyse en fonction du temps. ($T^{\circ}= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $E_n/S=0,1$)

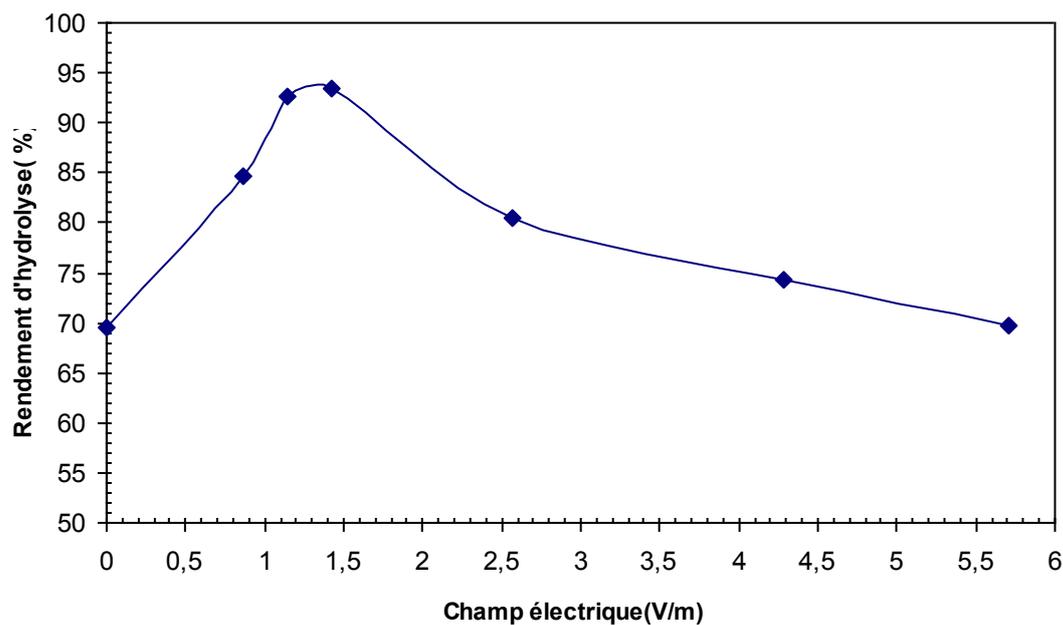


Figure N°15.a : Evolution du rendement d'hydrolyse en fonction du champ électrique ($T^0= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $\text{En}/\text{S}=0,1$).

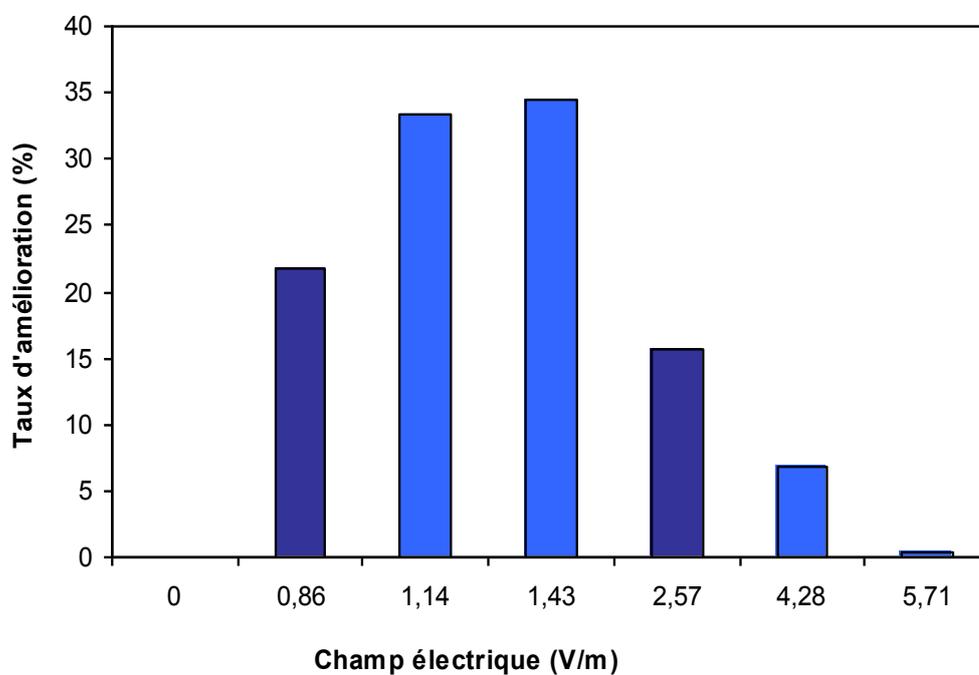


Figure N°15.b : Taux d'amélioration du rendement apporté par le champ électrique en fonction de la valeur appliquée ($T^0= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $\text{En}/\text{S}=0,1$).

Etude expérimentale

L'enzyme soumise à un potentiel plus élevé ou faible serait sans effet sur l'activité de l'enzyme.

Pour les essais ultérieurs, nous adopterons la valeur du champ électrique correspondant à $E=1,43\text{V/m}$, nous avons pris la valeur supérieure de la fourchette pour des raisons de sécurité, car en pratique, les valeurs appliquées en début de la manipulation chutent après un certain temps d'hydrolyse du fait du changement électrolytique intervenant dans la solution. Ce qui nous permettra d'avoir une marge de sécurité nécessaire.

L'évolution de la concentration du glucose et du rendement en fonction du temps sont données sur les figures N° 16 et 17.

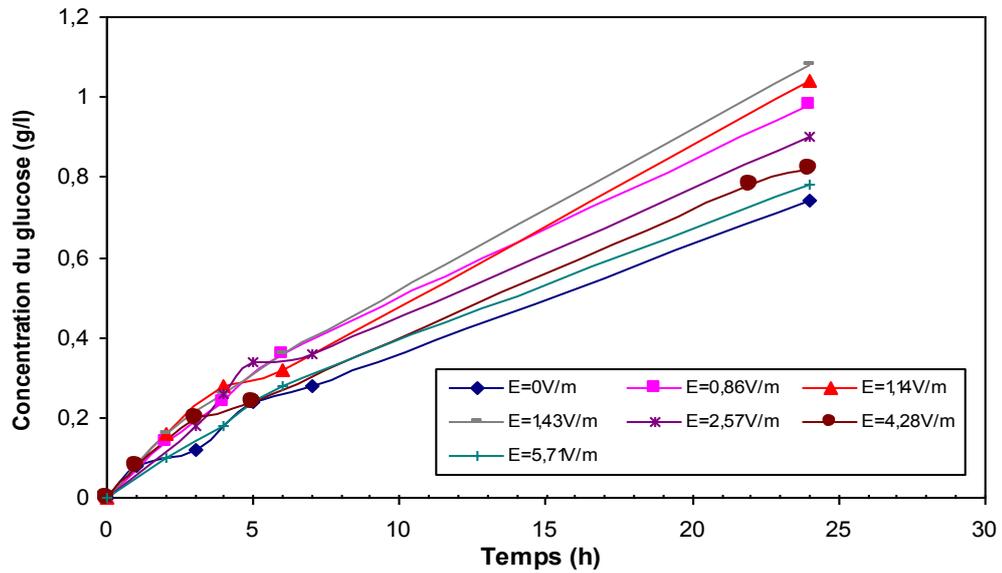


Figure N°16 : Evolution de la concentration du glucose en fonction du temps pour différentes valeurs du champ électrique. ($T^{\circ}= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $E_n/S=0,1$)

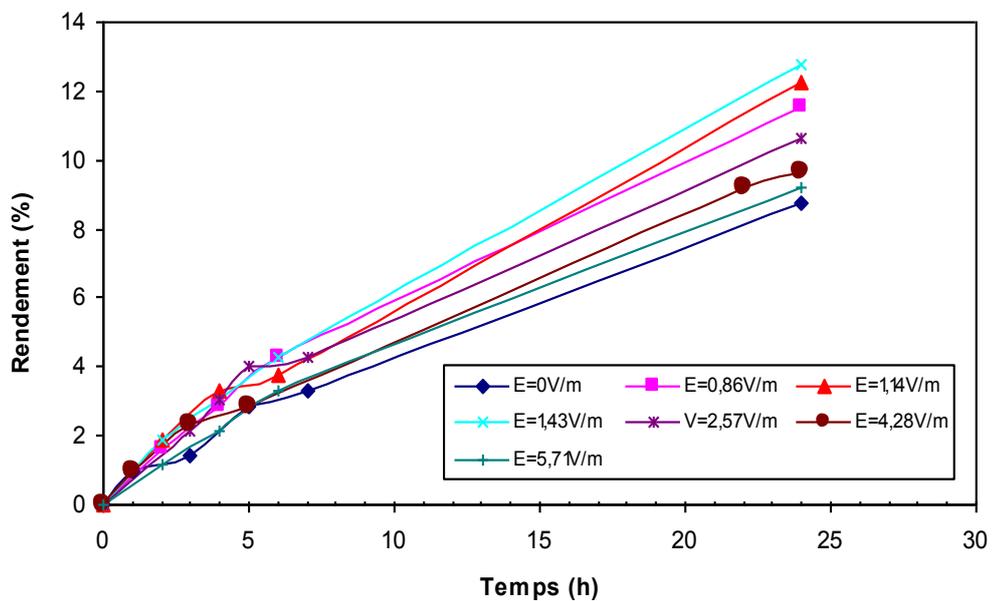


Figure N°17 : Evolution du rendement du glucose en fonction du temps. ($T^{\circ}= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $E_n/S=0,1$)

De la figure N°17 on peut tracer l'évolution du rendement du glucose en fonction de différents champs électrique.

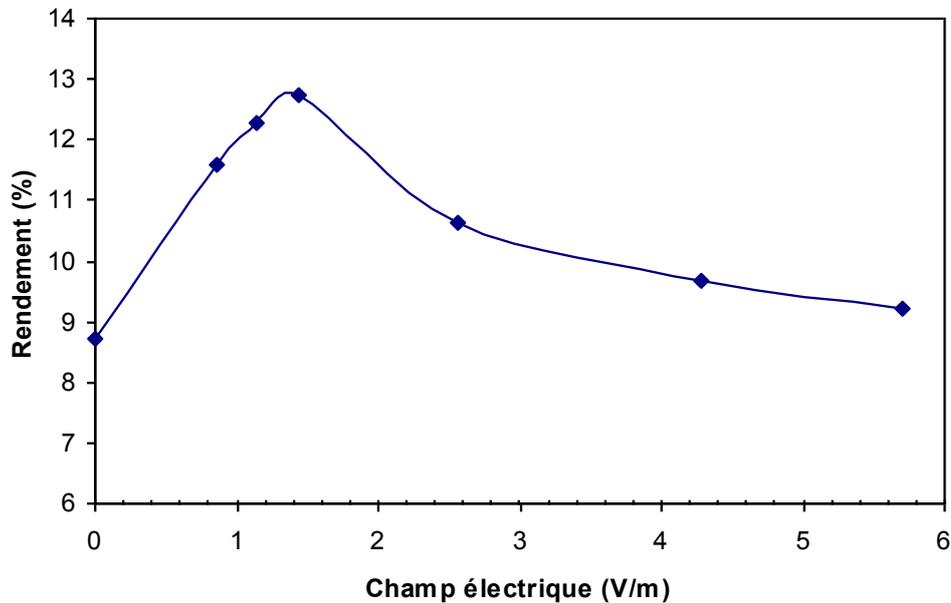


Figure N°18 : Evolution du rendement du glucose en fonction du champ électrique. ($T^0 = 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $\text{En/S}=0,1$)

En comparant les courbes de la figure N°15 et la figure N°18, nous remarquons que le taux du glucose est faible pour toute les valeurs du champ électrique tandis que le taux des sucres réducteurs est élevé, cela est dû au phénomène d'inhibition.

Le système enzymatique est inhibé par les produits d'hydrolyse en particulier par le cellobiose, le même résultat est obtenu par d'autres auteurs [3].

Pour confirmer cette interprétation nous avons utilisé la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour doser le glucose ainsi que le cellobiose.

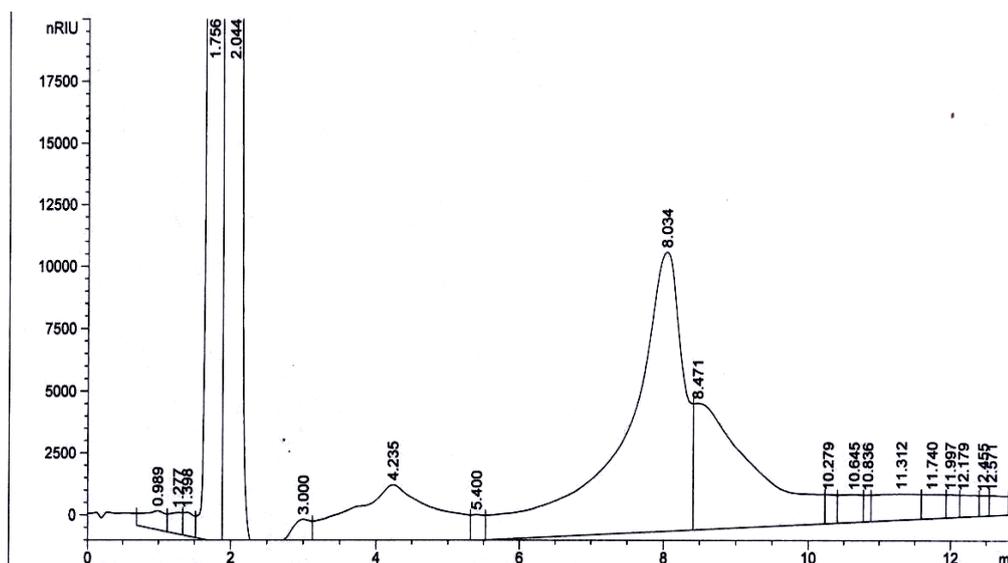


Figure N°19 : Chromatogramme du cellobiose pour l'échantillon (1)

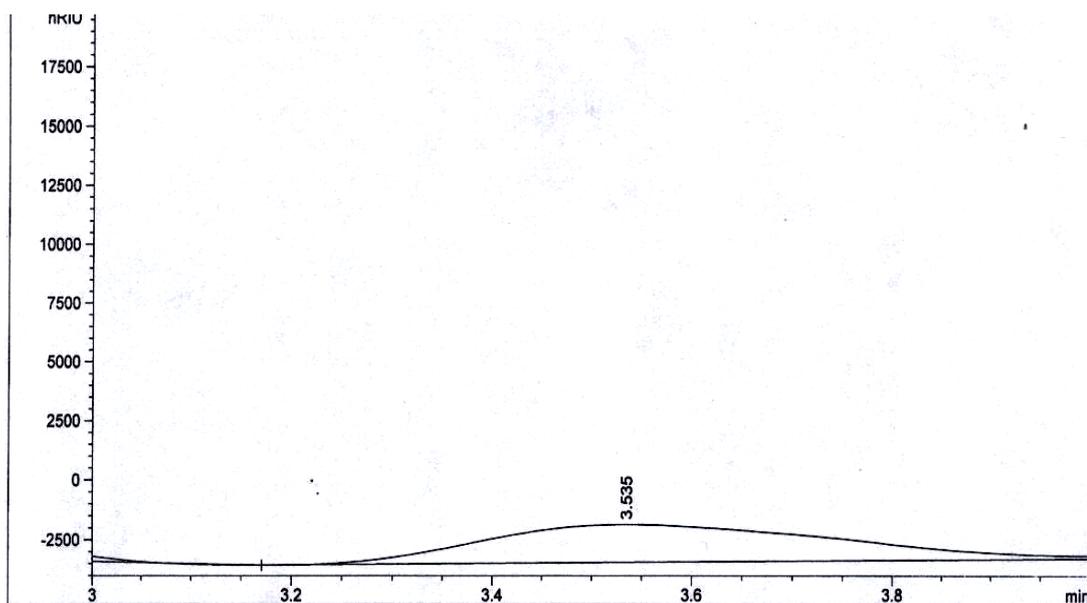


Figure N°20 : Chromatogramme du glucose pour l'échantillon (1)

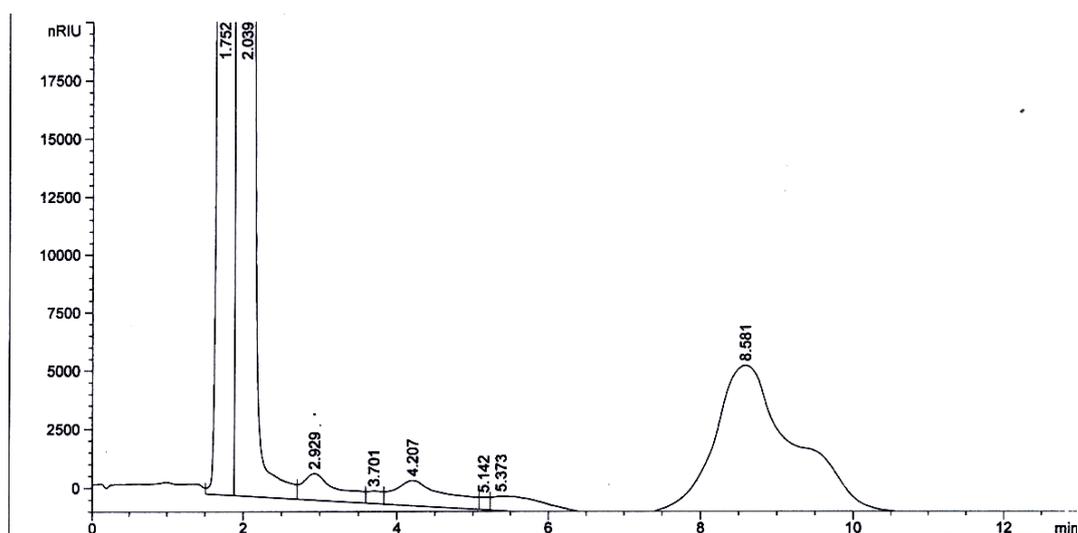


Figure N°21 : Chromatogramme du cellobiose pour l'échantillon (2)

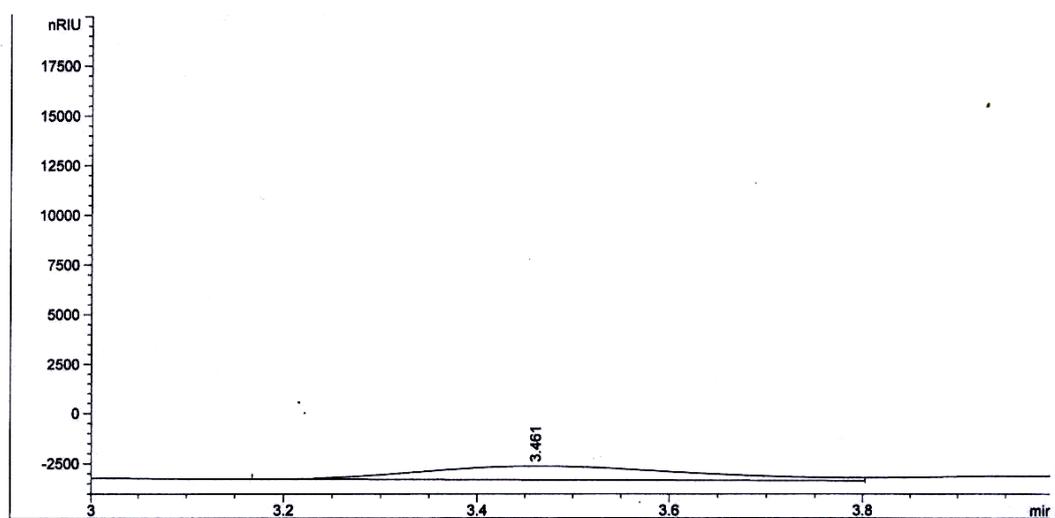


Figure N°22 : Chromatogramme du glucose pour l'échantillon (2)

Les concentrations du cellobiose et du glucose pour les deux échantillons sont données dans le tableau N° 10

Tableau N°10 : concentrations du cellobiose et du glucose

Echantillons	Concentration du glucose (g/l)	Concentration du cellobiose (g/l)
1	0,393	6,11
2	0,134	4,97

Action du champ électrique sur le substrat ou sur l'enzyme ?

Dans cette partie, nous avons voulu tenté de répondre à la question suivante : « En fait sur quelle entité (substrat ou enzyme) agit le champ électrique ? »

Pour tenter d'y remédier, nous avons mené les expériences suivantes :

Dans un premier essai (cas 1), nous avons appliqué le champ électrique optimal (1,43 V/m) au substrat pendant 24 heures. Nous avons ensuite suivi l'hydrolyse enzymatique sans champ électrique.

Dans un second essai (cas 2), nous avons appliqué un champ électrique de 1,43 V/m au substrat pendant 24 heures et nous avons suivi l'hydrolyse enzymatique couplée au champ électrique.

Ces deux cas sont comparés à deux essais déjà faits à savoir le cas 3 (en absence du champ électrique au cours de l'hydrolyse) et au cas 4 (en présence du champ électrique au cours de l'hydrolyse).

L'évolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps pour les deux cas est donnée sur la Figure N°23.

Nous remarquons d'après ces courbes qu'un grignon prétraité à la soude et soumis à l'action d'un champ électrique pendant 24 h puis mis en contact d'une enzyme (l'hydrolyse enzymatique s'effectue à un champ électrique nul), induit un rendement de saccharification de 76%. Tandis que la saccharification d'un grignon prétraité à la soude sans la présence d'un champ électrique, induit un rendement de 69 %.

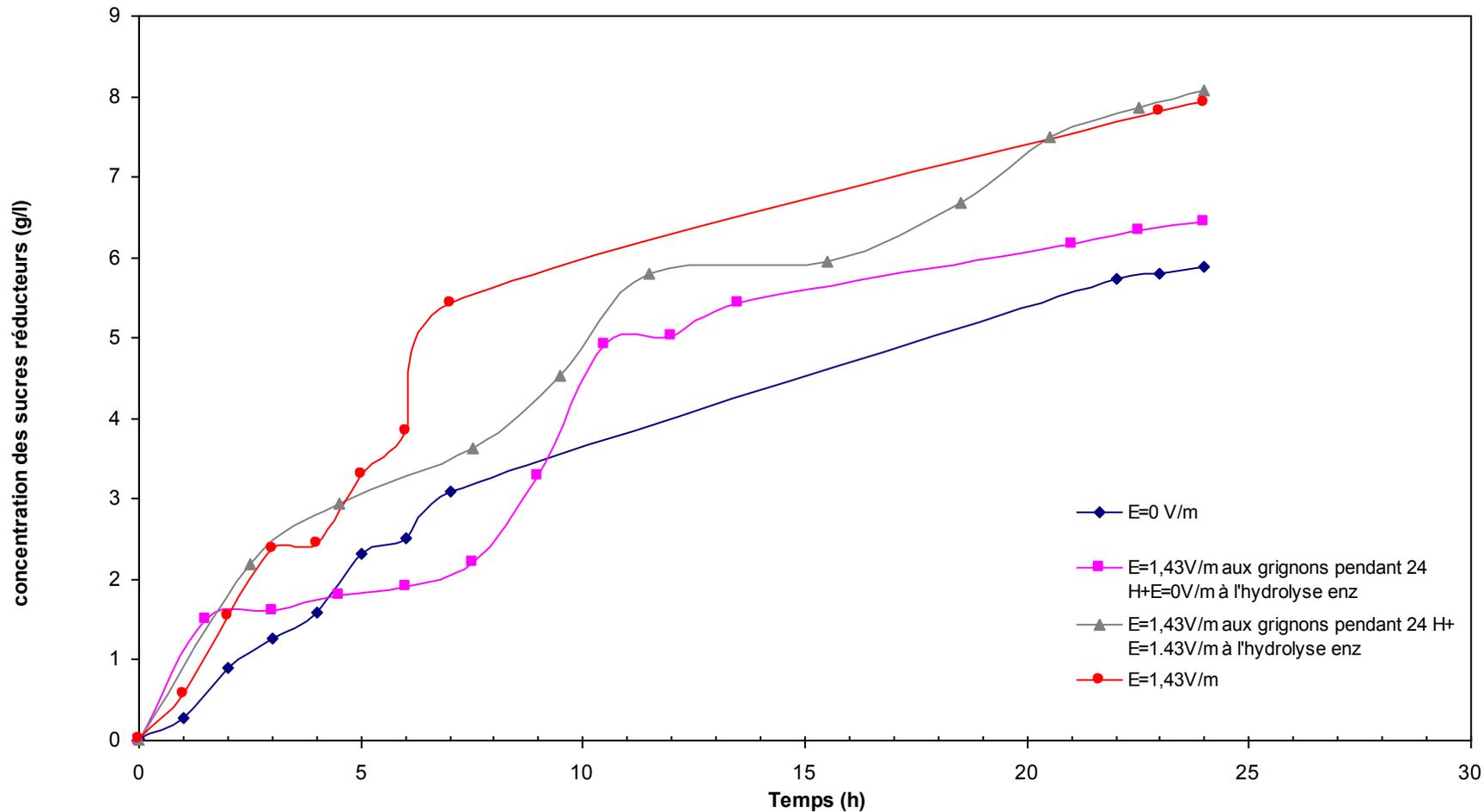


Figure N°23 : Evolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps. ($T^0=50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $E_n/S=0,1$)
 ($T^0= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $E_n/S=0,1$)

Etude expérimentale

En comparant ces deux cas, l'amélioration du rendement de saccharification est de 9,63%. Le champ électrique agit sur les sites du substrat en les rendant plus accessibles à l'enzyme, c'est l'électro-conditionnement du substrat. Cela a été mis en évidence par d'autres auteurs [67,68] qui démontrent que l'utilisation d'un potentiel électrique pouvait se traduire par une croissance des capacités d'adsorption d'un adsorbant, dans ce cas on parle de l'électrosorption ou de l'électroctivation

Dans notre cas, l'application d'un champ électrique au substrat fait augmenter l'affinité entre le substrat et l'enzyme.

En comparant le cas 1 et le cas 2, l'application d'un champ électrique créé par une tension continue provoque un flux de migration des particules chargées (l'enzyme) et de la suspension (substrat + enzyme).

Les particules se concentrent au voisinage de l'électrode de signe opposé à leur charge, la vitesse de migration des particules J_{ep} est proportionnelle au potentiel électrique appliqué et elle est représentée selon la relation suivante :

$$J_{ep} = U_{em} * E$$

E : champ électrique

U_{em} : mobilité électrophorétique des particules

La projection du champ électrique sur l'axe des Z est donnée par le théorème de Coulomb :

$$E = U/d$$

E : champ électrique

d : distance entre les deux plaques

U : potentiel électrique

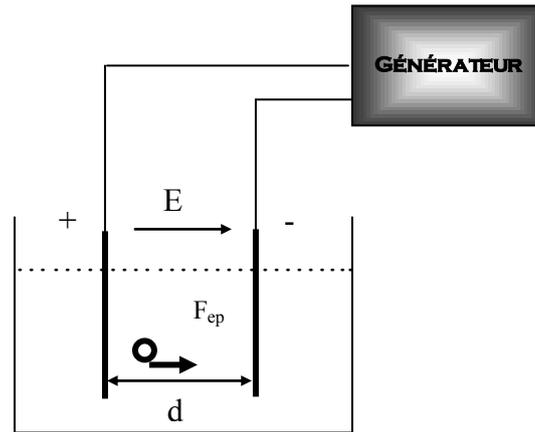


Figure N°24 : Influence du champ électrique sur l'hydrolyse enzymatique

○ : Particule chargée

F_{ep} : force électrophorétique

L'hydrolyse enzymatique en présence d'un champ électrique de $E=1,43$ V/m d'un grignon d'olive prétraité à la soude et soumis à un champ électrique de $1,43$ V/m pendant 24 h, induit un rendement de 96%. Ce pendant, lorsque la saccharification du grignon d'olive est couplée à un champ électrique optimal ($E=1,43$ V/m), le rendement est de 94%, donc une amélioration de 2% du rendement de saccharification est obtenue.

Etant donné, le faible gain apporté par le couplage électroactivation+ électrohydrolyse enzymatique par rapport en absence de l'électroactivation, on déduit qu'il est préférable de faire une hydrolyse enzymatique couplée à un champ électrique sans passer par le cas 2.

Toutefois, il est bon de rappeler qu'on obtient une amélioration du rendement de 34 % de saccharification d'un substrat en présence du champ électrique ($E=1,43$ V/m) comparativement à la saccharification d'un substrat sans application du champ électrique et ce dans les mêmes conditions opératoires.

IV-PLAN D'EXPERIMENTATION :

Dans ce présent paragraphe, on fera appel aux notions théoriques citées dans la partie bibliographique pour une application de processus de la modélisation de la l'électro-hydrolyse enzymatique du grignon d'olive.

Cette modélisation se fera selon des plans expérimentaux tels qu'ils ont été définis précédemment (chapitre VI).

On commencera d'abord par la désignation de nos variables d'entrée et de sortie.

IV.1 Désignation des variables d'entrée et de sortie :

La modélisation du phénomène de l'hydrolyse enzymatique du grignon d'olive en présence du champ électrique nécessite l'établissement d'une relation entre les variables d'entrées qui sont dans notre cas : X_1 ; X_2 ; X_3 ; X_4 , X_5 et X_6 désignant respectivement la température du processus de prétraitement, le rapport masse en gramme du grignon d'olive/ masse en gramme de la soude, le pH, la température de l'hydrolyse, le rapport masse en gramme de l'enzyme / masse en gramme du substrat (En/S) et la valeur du champ électrique appliqué, et la réponse Y qui représente le rendement d'hydrolyse exprimé en %.

Celles-ci sont choisies d'une façon sélective et représentées dans le tableau N°11.

Tableau N°11 : Les conditions expérimentales

	LES FACTEURS (X_i)	UNITES	(-1)	(+1)
X ₁	Tp (Température du prétraitement)	°C	90	110
X ₂	R	g/g	10	20
X ₃	pH		4	6
X ₄	T (Température)	°C	40	60
X ₅	En/S	g/g	0.06	0.24
X ₆	E (Champ Electrique)	V /m	0,86	1,74

IV.2 Elaboration des plans d'expériences :

La méthodologie à suivre sera :

- L'élaboration de la matrice d'Hadamard qui déterminera les variables à prendre en considération ;
- Suivi d'une application de la matrice factorielle complète qui nous donnera le modèle final à adopter après chaque amélioration suggérée dans le cas où la matrice d'Hadamard n'est pas suffisante.

La matrice d'Hadamard :

La construction de cette matrice se fait à partir du tableau N°5 donnant la ligne de départ correspondant à K facteur égal à 6, le nombre d'expérience à réaliser sera 8 expériences. La ligne de départ est la suivante :

$$+ 1 ; + 1 ; + 1 ; - 1 ; + 1 ; - 1 ; - 1$$

Application de l'algorithme d'Hadamard :

L'application de l'algorithme donné au chapitre VI, nous donne le plan d'expérience en variables codées.

Les réactions d'hydrolyse qui ont été faites sont représentées dans le tableau N°12.

Etude expérimentale

Tableau N° 12 : Plan d'expérimentation utilisé lors de l'hydrolyse enzymatique du grignon d'olive.

N°	<i>Variables Réduites</i>						<i>Variables Réelles</i>					
	X₁	X₂	X₃	X₄	X₅	X₆	Tp(°C)	R (g_{substrat}/g_{NaOH})	pH	T(°C)	En/S (g_{enz}/g_{substrat})	E(V/m)
1	1	1	1	-1	1	-1	110	20	6	40	0,24	0.86
2	-1	1	1	1	-1	1	90	20	6	60	0,06	1.74
3	-1	-1	1	1	1	-1	90	10	6	60	0,24	0.86
4	1	-1	-1	1	1	1	110	10	4	60	0,24	1.74
5	-1	1	-1	-1	1	1	90	20	4	40	0,24	1.74
6	1	-1	1	-1	-1	1	110	10	6	40	0,06	1.74
7	1	1	-1	1	-1	-1	110	20	4	60	0,06	0.86
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	90	10	4	40	0,06	0.86

EXPRESSION DES RESULTATS :

L'application de la méthode de la planification d'expériences dans cette première partie se traduira par l'élaboration, selon le protocole expérimental donné précédemment des huit expériences suivantes:

- Essai N°1 : L'hydrolyse enzymatique du substrat ayant subi un prétraitement à la soude avec une température de prétraitement à 110°C à un taux R de 24,32%. Le pH du mélange réactionnel est de 6 et ce à une température de 40°C. Le rapport En/S est 0,24 avec application d'un champ électrique d'une valeur de 0,86 V/m.
- Essai N°2 : L'hydrolyse enzymatique du substrat ayant subi un prétraitement à la soude avec une température de prétraitement à 90°C à un taux R de 30,46%. Le pH du mélange réactionnel est de 6 et ce à une température de 60°C. Le rapport En/S est 0,06 avec application d'un champ électrique d'une valeur de 1,74 V/m.
- Essai N°3 : L'hydrolyse enzymatique sur un substrat ayant subi un prétraitement à la soude avec une température de prétraitement à 90°C à un taux R de 16,53%. Le pH du mélange réactionnel est de 6 et ce à une température de 60°C. Le rapport En/S est 0,24 avec application d'un champ électrique d'une valeur de 0,86 V/m.
- Essai N°4 : L'hydrolyse enzymatique du substrat ayant subi un prétraitement à la soude avec une température de prétraitement à 110°C à un taux R de 10,86%. Le pH du mélange réactionnel est de 4 et ce à une température de 60°C. Le rapport En/S est 0,24 avec application d'un champ électrique d'une valeur de 1,74 V/m.
- Essai N°5 : L'hydrolyse enzymatique du substrat ayant subi un prétraitement à la soude avec une température de prétraitement à 90°C à un taux R de 25,38%. Le pH du mélange réactionnel est de 4 et ce à une température de 40°C. Le rapport En/S est 0,24 avec application d'un champ électrique d'une valeur de 1,74 V/m.
- Essai N°6 : L'hydrolyse enzymatique du substrat ayant subi un prétraitement à la soude avec une température de prétraitement à 110°C à un taux R de 76,98%. Le pH du mélange réactionnel est de 6 et ce à une température de 40°C. Le rapport En/S est 0,06 avec application d'un champ électrique d'une valeur de 1,74 V/m.

- Essai N°7 : L'hydrolyse enzymatique sur un substrat ayant subi un prétraitement à la soude avec une température de prétraitement à 110°C à un taux R de 22,79%. Le pH du mélange réactionnel est de 4 et ce à une température de 60°C. Le rapport En/S est 0,06 avec application d'un champ électrique d'une valeur de 0,86 V/m.
- Essai N°8 : L'hydrolyse enzymatique sur un substrat ayant subi un prétraitement à la soude avec une température de prétraitement à 90°C à un taux R de 75,71%. Le pH du mélange réactionnel est de 4 et ce à une température de 40°C. Le rapport En/S est 0,06 avec application d'un champ électrique d'une valeur de 0,86 V/m.

L'évolution de la concentration des sucres réducteurs ainsi que le rendement en fonction du temps pour les huit essais est donnée en annexe.

L'accomplissement de ces huit essais et en calculant le rendement de l'hydrolyse nous permettent de remplir le tableau N°13

INTERPRETATION DES RESULTATS :

Nous rappelons que l'objectif de ces essais est la modélisation du phénomène de l'hydrolyse enzymatique du grignon d'olive en présence du champ électrique en effectuant le moins possible d'essais.

L'application de la matrice d'Hadamard répond non seulement à ce besoin car, avec seulement 8 essais, il nous permet d'accéder à des informations très utiles.

Même si le tableau d'Hadamard n'aboutit pas, il permet souvent de limiter le nombre de paramètres à étudier et de n'en prendre uniquement que les plus influents dans la deuxième étape qui est l'établissement du plan factoriel complet.

Etude expérimentale

Tableau N° 13 : Résultats des essais du plan d'Hadamard

N°	Rendement (%)	<i>Variables Réduites</i>					<i>Variables Réelles</i>						
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	T _p (°C)	R (g _{substrat} /gNaOH)	pH	T(°C)	En/S (g _{enz} /g _{substrat})	E(V/m)
1	24,32	1	1	1	-1	1	-1	110	20	6	40	0,24	0,86
2	30,46	-1	1	1	1	-1	1	90	20	6	60	0,06	1,74
3	16,53	-1	-1	1	1	1	-1	90	10	6	60	0,24	0,86
4	10,86	1	-1	-1	1	1	1	110	10	4	60	0,24	1,74
5	25,38	-1	1	-1	-1	1	1	90	20	4	40	0,24	1,74
6	76,98	1	-1	1	-1	-1	1	110	10	6	40	0,06	1,74
7	22,79	1	1	-1	1	-1	-1	110	20	4	60	0,06	0,86
8	75,71	-1	-1	-1	-1	-1	-1	90	10	4	40	0,06	0,86

IV.3-Application du modèle d'ordre 1 sans interaction :

Le polynôme s'écrit de la manière suivante :

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_5 X_5 + b_6 X_6$$

Le calcul des constantes b_i se fait par la méthode des moindres carrés. Nous nous sommes servis de l'utilitaire Analyse de l'Excel Microsoft ®. Les résultats sont rapportés dans les tableaux N°14 et 15.

Tableau N°14: Détermination des coefficients du modèle

	<i>Coefficients</i> b_i	<i>Valeurs des</i> b_i	<i>Erreur-type</i>	<i>Limite inférieure pour</i> <i>seuil de confiance = 95%</i>	<i>Limite supérieure pour</i> <i>seuil de confiance = 95%</i>
Constante	b_0	35,37625	0,04375	34,8203535	35,9321465
Tp	b_1	-1,64375	0,04375	-2,19964646	-1,08785354
R	b_2	-9,64375	0,04375	-10,1996465	-9,08785354
pH	b_3	1,69125	0,04375	1,13535354	2,24714646
T	b_4	-15,21625	0,04375	-15,7721465	-14,6603535
En/s	b_5	-16,10875	0,04375	-16,6646465	-15,5528535
E	b_6	0,54375	0,04375	-0,01214646	1,09964646

La comparaison en valeurs absolues des coefficients obtenus avec les erreurs types commises pour leur détermination montre que les écarts sont négligeables (inférieurs à 0,04) (voir tableau N°14), ceci nous permet donc de les retenir sans exception.

D'après ce tableau, nous remarquons que les trois facteurs qui ont un poids plus élevé que les autres sont : X_2 , X_4 et X_5 , c'est-à-dire, les R, T, En/S.

La valeur $b_2 = -9,64$ signifie qu'en moyenne, le rendement diminue de $2 \times 9,64 = 19,28\%$, quand on passe d'un rapport grignon d'olive / NaOH de 10 (niveau -1) à un rapport de 20 (un niveau 1).

Les trois autres facteurs : X_1 , X_3 , X_6 ont un poids faible en les comparant avec les autres facteurs, mais ils sont significatifs.

Tableau N°15 : Statistique de la régression du modèle

<i>Statistiques de la régression</i>	
Coefficient de détermination multiple R	0,999998378
Coefficient de détermination R^2	0,999996755
Coefficient de détermination ajusté R^2	0,999977286
Erreur-type	0,123743687
Observations	8

L'examen du coefficient de corrélation $R^2 = 0,999998$ ainsi que celui de la détermination multiple $R=0,999996$ calculé à cet effet permet la constatation que le modèle proposé est très bon et ne nécessite donc pas une amélioration supplémentaire.

Les figures N°25a à 25e représentant les courbes de régressions des variables X_1 , à X_6 , montrent qu'effectivement le modèle proposé s'approche fortement du phénomène étudié, du fait que les valeurs de la réponse (Y) expérimentales et leurs prévisions fournies par le modèle proposé s'approchent le plus possible et coïncident souvent.

Le modèle mathématique postulé :

Le modèle mathématique fourni par la méthode des moindres carrés retenus finalement sera le suivant:

$$Y=35,37-1,64X_1-9,64X_2+1,69X_3-15,21X_4-16,10X_5+0,54X_6$$

Le domaine de validité du modèle est le suivant:

90°C	$<$	T_p	$<$	110°C
10	$<$	R	$<$	20
4	$<$	pH	$<$	6
40°C	$<$	T	$<$	60°C
0,06	$<$	En/S	$<$	0,24
$0,86 \text{ V/m}$	$<$	E	$<$	$1,74 \text{ V/m}$

Analyse des résidus

L'analyse des résidus représentée sous forme de graphes montre une distribution uniforme des résidus par rapport à l'axe des abscisses. Ceci nous permet de dire que le modèle proposé est celui qui répond le mieux aux critères de validation des modèles.

Etude expérimentale

Tableau N°16 : analyse des résidus

<i>Observation</i>	<i>Prévisions Rendement</i>	<i>Résidus</i>	<i>Résidus normalisés</i>
1	24,34375	-0,04375	-0,93541435
2	30,50375	-0,04375	-0,93541435
3	16,48625	0,04375	0,93541435
4	10,90375	-0,04375	-0,93541435
5	25,33625	0,04375	0,93541435
6	76,93625	0,04375	0,93541435
7	22,74625	0,04375	0,93541435
8	75,75375	-0,04375	-0,93541435

Figure N°25.a : Rendement de saccharification en fonction de la température de prétraitement

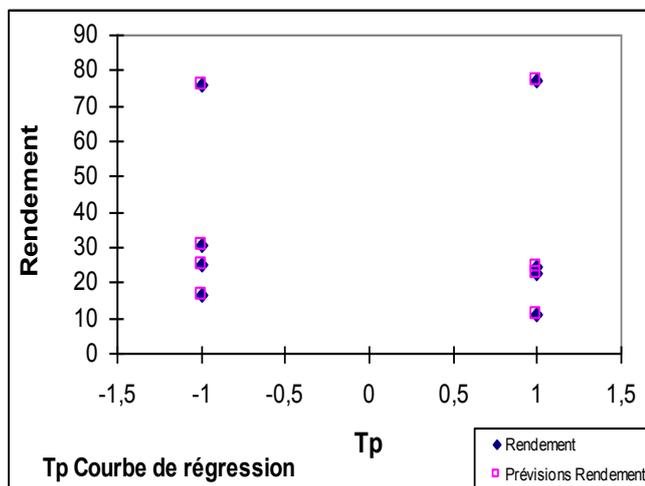


Figure N° 25.b : Rendement de saccharification en fonction du rapport R

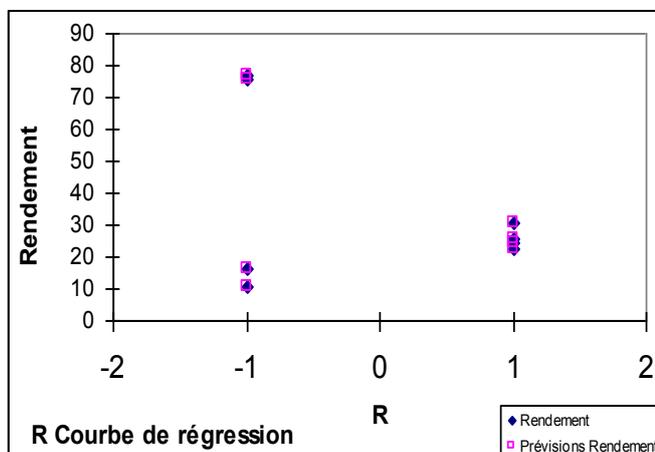


Figure N°25.c : Rendement de saccharification en fonction de la température de la réaction enzymatique

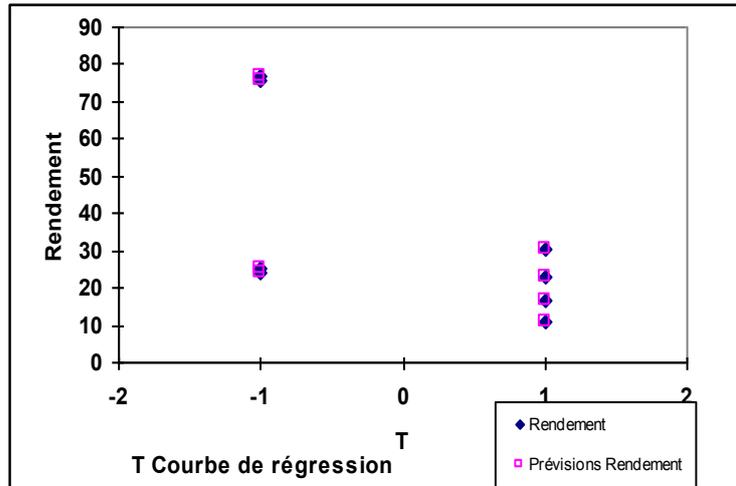


Figure N°25.d : Rendement de saccharification en fonction du rapport En/S

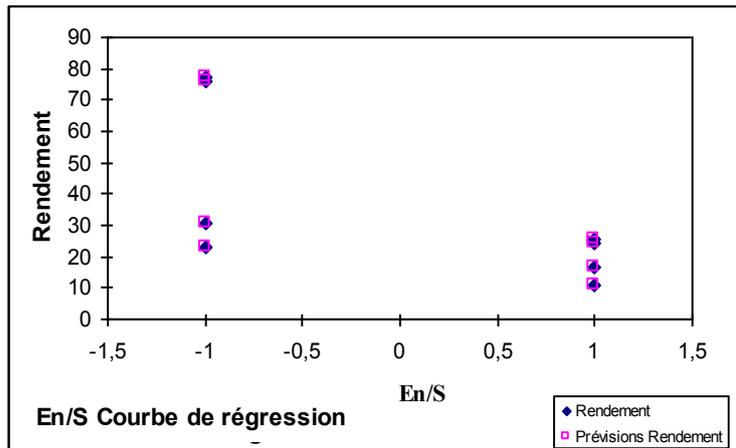


Figure N°25.e : Rendement de saccharification en fonction du champ électrique

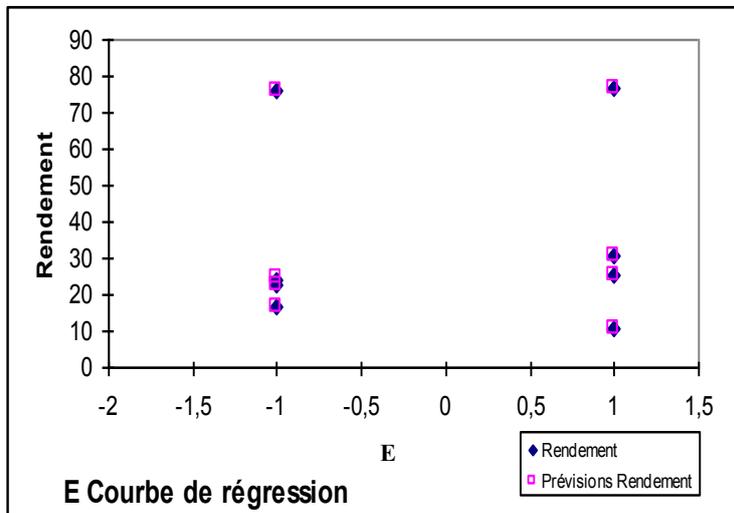


Figure N°25 a à 25.e : Courbes de régression

Etude expérimentale

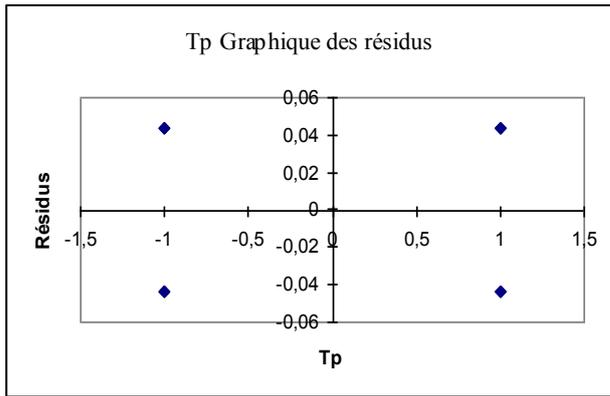


Figure N°26. a : Résidus en fonction de la

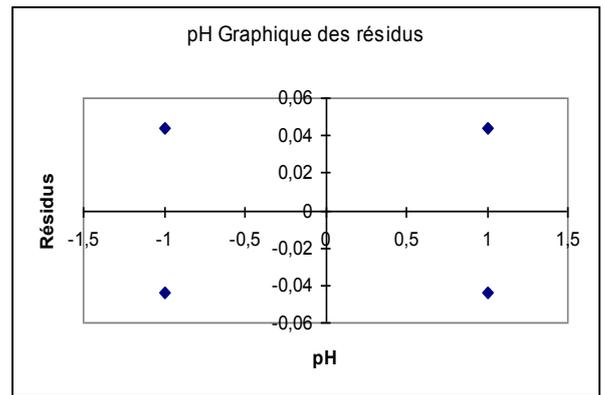


Figure N°26. b : Résidus en fonction du

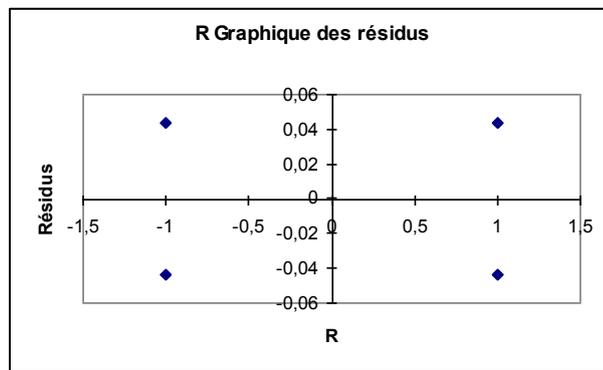


Figure N°26. c : Résidus en fonction du R

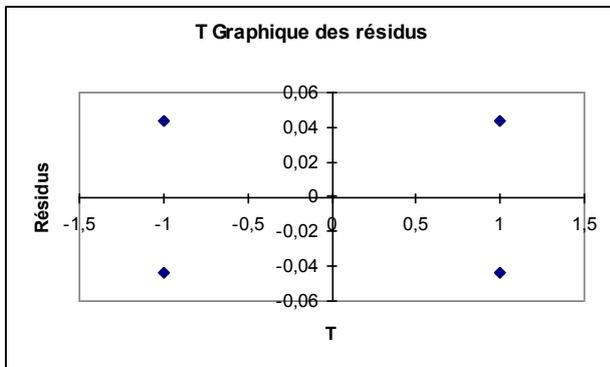


Figure N°26. d : Résidus en fonction de la température

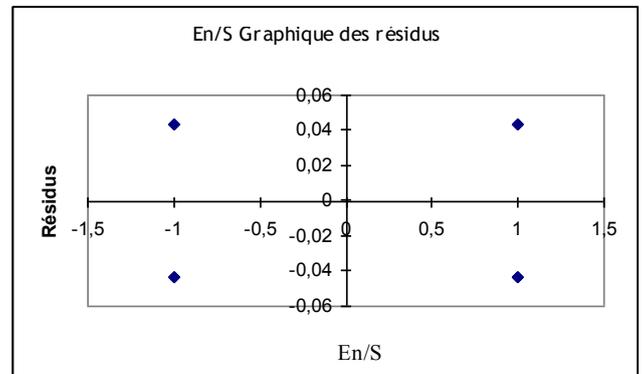


Figure N°26. e : Résidus en fonction du rapport En/S

Figure N°26.a à 26.e: Les résidus

Conclusion

Notre étude était inscrite dans le cadre d'une saccharification d'un rejet d'huilerie « le grignon d'olive » avec application d'un champ électrique, en effectuant les étapes suivantes :

- Caractérisation chimique d'un grignon non traité et traité à la soude ;
- Essai de faisabilité du couplage hydrolyse enzymatique, champ électrique ;
- Effet du champ électrique sur un grignon non traité ;
- Optimisation du champ électrique.

A l'issue de ce travail, nous avons dégagé un certain nombre de conclusions à savoir :

- Le grignon brut utilisé est caractérisé par une forte teneur en cellulose qui constitue l'objectif essentiel de l'hydrolyse enzymatique, ainsi qu'en lignine qui elle constitue un obstacle pour le même procédé.

- L'étude de l'effet du traitement à la soude sur la composition chimique des grignons d'olive a montré, que la soude agit principalement sur l'hémicellulose et la lignine.

- L'hydrolyse enzymatique d'un grignon prétraité à la soude soumis à un champ électrique de 2.57 V/m permet d'obtenir une quantité plus importante en sucres réducteurs, en comparant avec un grignon traité à la soude sans champ électrique.

- L'application d'un champ électrique de 1.14 V/m à la saccharification d'un grignon non traité à la soude donne un rendement plus faible qu'une hydrolyse d'un grignon traité à la soude et sans champ électrique.

Le champ électrique influe positivement sur l'hydrolyse enzymatique, au bout de 24 heures le taux d'hydrolyse est amélioré de 11% pour le cas d'une hydrolyse enzymatique du substrat traité à la soude avec application d'un champ électrique, par rapport à une hydrolyse enzymatique du substrat traité à la soude sans application d'un champ électrique, tandis que pour un substrat non traité le rendement d'hydrolyse est beaucoup plus inférieur (35 %), en le comparant au taux d'hydrolyse d'un substrat traité à la soude sans application d'un champ électrique qui est de 70%. Donc le champ électrique ne compense pas le traitement chimique, il serait donc préférable de prétraiter le grignon et de soumettre la réaction enzymatique à un champ électrique.

- La valeur optimale du champ électrique pour obtenir le meilleur rendement d'hydrolyse aux conditions optimales $T^0 = 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$, $E/S=0.1$ est de 1.43V/m , cette dernière est suffisante pour produire une concentration maximale en sucres réducteurs. L'enzyme soumise à un potentiel plus élevé pourrait se colmater sur les électrodes ; une valeur faible serait sans effet sur l'activité de l'enzyme.

- Un grignon prétraité à la soude et soumis à l'action d'un champ électrique pendant 24 h puis mis en contact d'une enzyme (l'hydrolyse enzymatique s'effectue à un champ électrique nul), induit un rendement de saccharification de 76%. Tandis que la saccharification d'un grignon prétraité à la soude sans la présence d'un champ électrique, induit un rendement de 69 %. En comparant ces deux cas l'amélioration du rendement de saccharification est de 7%. Le champ électrique agit sur les sites du substrat en les rendant plus accessibles à l'enzyme, c'est l'électro-conditionnement du substrat

- L'hydrolyse enzymatique en présence d'un champ électrique de $E=1.43\text{ V/m}$ d'un grignon d'olive prétraité à la soude et soumis à un champ électrique de 1.43 V/m pendant 24 h, induit un rendement de 96%. Ce pendant, lorsque la saccharification du grignon d'olive est couplée à un champ électrique optimal ($E=1.43\text{ V/m}$), induit un rendement de 94%, donc une amélioration de 2% du rendement de saccharification.

Puisque l'amélioration du rendement est faible (2%) et pour des raisons économiques, en déduit qu'il est préférable de faire une hydrolyse enzymatique couplée à un champ électrique sans passer par le cas 2.

L'utilisation d'un plan factoriel nous a permis d'obtenir un polynôme de degrés 1 : $Y=35.93-1.088X_1-9.09 X_2+2.25 X_3-14.66 X_4-15.55 X_5+1.1 X_6$

L'application de l'ultrafiltration pour la séparation entre le mélange enzyme-substrat et les produits de la réaction est nécessaire pour lever l'inhibition observée en réacteur discontinu, il faut que la membrane de ultrafiltration soit imperméable à l'enzyme.

Références Bibliographiques

- [1] **G. Parsiegla** « *The crystal structure of the processive endocellulase CelF of Clostridium cellulolyticum in complex with athiooligosaccharide inhibitor at 2.0 Å resolution* » The EMBO Journal, Vol 17, No 19, pp 5551–5562, 1998.
- [2] **F. Halet** « *Hydrolyse enzymatique des grignons d'olive* » Thèse de Magister ENP 1999.
- [3] **N. Mameri, F. Hamdache, N. Abdi, D. Belhocine, H. Grib, H. Lounici et D.L. Piron** « *Enzymatic saccharification of solid residue of olive mill in a batch reactor* » Biochemical Engineering Journal, vol 6, pp177-183, 2000.
- [4] **M. Bazhal, N. Lebovka, E. Vorobiev** « *Optimisation of pulsed electric field strength for electroporation of vegetable tissues* » Biosystems Engineering, vol 3, No 86, pp 339-345, 2003
- [5] **N. Mameri, S.Oussedik, R.Yeddou, D.L. Piron, D. Belhocine, H. Grib et H. Lounici** « *Enhancement of ultrafiltration flux by coupling static turbulence and electric field* Separation and Purification Technology, vol 17, pp 203-211, 1999.
- [6] **A. Cheich** « *Electrosorption sur un lit de charbon actif en grain* » Mémoire de Magister, ENP, 1999.
- [7] **A. Mekioui** « *Etude de l'évolution des caractéristiques physico-chimique de l'huile d'olive au cours du stockage* » PFE, USTHB, 1993.
- [8] **L. Daoudi** « *Etude des caractères végétatif et fructifère de quelques variétés d'oliviers locales et étrangères cultivées dans la station expérimentale d'arboriculture fruitière de Sidi Aïch* » Thèse de Magister, INA, 1994.
- [9] Bulletin FAO de statistiques No2, vol 3, 2002.
- [10] **R. François** « *les industries des corps gras* » Ed tech et doc, Genève, 1974.
- [11] **N. Benhayia et K. Zein** « *Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées* » 2ème Conférence Internationale Swiss Environmental Solutionsfor Emerging Countries (SESEC II) Lausanne, Suisse, 28-29 janvier 2003.
- [12] « *L'olivier, arbre des dieux* » Journées méditerranéennes de l'olivier, Nîmes, 7-9 Avril 2000.
- [13] Petit Larousse illustré, 1991.

- [14] **A. Nefzaoui** « *Valorisation des résidus lignocellulosique dans l'alimentation des ruminants par les traitements au alcalis* » Thèse d'état, Université catholique de Louvain- La Neuve Belgique, 1985.
- [15] **A. Nefzaoui** « *Valorisation des sous produits de l'olivier* » Option méditerranéennes série séminaire, ARIANA, Tunisie, N^o16, 101-108, 1991.
- [16] **L. Flandory** « *L'olivier : moins de kilos, plus de watt* » Biofutur, 26-28 décembre 1995.
- [17] **J. Pourquie** « *Conversion des composés lignocellulosiques par hydrolyse enzymatique* » Biotechnologie, Scriban, Ed Tech et doc, Lavoisier, Paris, 1993.
- [18] **U. Pallota** « *Les sous produits de l'industrie oléicole et leurs utilisation* » Séminaire oléicole international, FAO, Rome, 1967.
- [19] **A. Baçaoui, A. Yaacoubi, A. Dahbi, C. Bennouna, J. Ayele et M. Orazet** « *Activated carbon production from moroccan olive wastes-influence of some factors* » Environmental Technology, vol 19, pp 1203-1212,1998.
- [20] **N. Mameri, F. Hamdache, N. Abdi, D. Belhocine, H. Grib, H. Lounici et D. L. Piron** « *Enzymatic saccharification of olive mill solid residue in a membrane reactor* » Journal of Membrane Science, vol 178, pp 121-130, 2000.
- [21] **S. Alibes** « *Valorisation des produits de l'olivier* » Nouvel olivier, 4, 4, 123-128, 1988.
- [22] **A. Abdouli** « *Valorisation alimentaire des grignons d'olive dans l'alimentation des ruminants* » PFE, INA, 1988.
- [23] **M. A. Kähkönen** « *Biodegradation activities in coniferous forest soils and freshwater sediments* » Séminaire, Viikki biocenter, 2003.
- [24] **J. L. Guignard** « *Biochimie végétale* » 2^{ème} édition de l'abrégé, Dunod, Paris 2000.
- [25] **G. Richter** « *Métabolisme des végétaux physiologie et biochimie* » Ed Masson, 1986.
- [26] **F. Chapville** « *Biochimie* » Herman; Editeur des sciences et des arts, 1974.
- [27] **L. P. Ramos** « *The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials* » Quim Nova, vol 26, No 6 , pp 863-871, 2003.
- [28] **Y.H. P. Zhang et L. R. Lynd** « *Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems*» Wiley InterScience, pp 797-820, 10 November 2004.

[29] **S. Thiebaud** « *Valorisation chimique de composés lignocellulosique : obtention de nouveau matériaux* » Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de TOULOUSE, 1995.

[30] **N. Chetibi** « *Contribution à l'étude de la microflore cellulolutive de Djelfa : étude de l'activité de trois souches bactériennes non mycéliennes* » Thèse de Magister, USTHB, 1987.

[31] **B. Monties** « *Les polymères pariétaux et alimentaires non azotés* » édition Gauthier Villards, 1980.

[32] **H. Palonen** « *Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose* » VTT Publication 520, 16 April 2004.

[33] **A. Mourache** « *Hydrolases et dépolymérase, enzymes d'intérêts industriels* » édition Gauthier Villards Bordas, 1985.

[34] **C. SATGE** « *Etude de nouvelles stratégies de valorisation de mono et polysaccharides* » Thèse de Doctorat, Université de Limoges, 2002.

[35] **T. Aksil** « *Immobilisation des cellulases sur une résine anionique* » Thèse de Magister, USTHB, 1994.

[36] **T. M. Wood** « *Enzyme and mechanisms involved in microbial cellulolysis* » dans « *Biochemistry of microbial degradation* » Kluwer Academic Publishers, 1994.

[36] **J. C. Ogier, D. Ballerini, J. P. Leygue, L. Rigal et J. Pourquoié** « *Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique* » Oil Gas & Gas Science and Technology, Revue de l'IFP, vol 54, No 1, pp67-94, 1999.

[38] **D. B. Rivers** « *Factors affecting the enzymatic hydrolysis of municipal solid waste components* » Biotech. Bioeng, vol 31, pp278-281, 1988.

[39] **C. Vidaud, S. Roussos, M. Raimbault et F. Deschamps** « *Effet de divers prétraitements sur l'accessibilité de la cellulose de la paille de blé aux cellulases de *Trichoderma harzianum** » Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Bio, No 45, pp 17-23, 1982.

[40] **R. Prunet** « *Réaction chimique – Sciences et technologie de laboratoire* » Dunod, Paris, 1995.

[41] **L. Antropov** « *Electrochimie théorique* » Edition Mir, Moscou, 1979.

[42] **J. Magné** « *Biophysique* » Edition ellipses, 1991.

[43] **G. Tresset** « *Electromanipulation de cellules et de liposomes dans un dispositif micrométrique* » Site Internet : [www. médecine-électricité.fr](http://www.médecine-électricité.fr)

[44] **L. Bergel** « *Electroenzymatic reactors with coenzyme regeneration: a theoretical approach* » *Biotechnology and Bioengineering*, vol 28, pp 728-735, 1986.

[45] **S. Cosnier** « *Fabrication of amperometric biosensors by entrapment of enzymes in functionalised polypyrrole films* » *Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol 76, pp 1000-1007, December 1998.

[46] **J. P. Magnin, F. Baillet, A. Boyer, R. Zlateve, M. Luca, A. Gheruy et P. Ozil** « *Augmentation par régénération électrochimique du substrat d'une biomasse-thiobacillus ferroxidans DSM- pour un procédé biologique de récupération de métaux* » *Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol 76, pp 978-984, December 1998.

[47] **G. Maini, A. K. Sharman, G. Sunderland, C. J. Knowles et S. A. Jackman** « *An integrated method incorporating sulfur oxidizing bacteria and electrokinetics to enhance removal of copper from contaminated soil* » *Environ. Sci. Technol.* Vol 34, pp 1081-1087, 2000.

[48] **J. Prussacova** « *Influence des champs magnétiques sur le développement de la mousse Physcomitrella patens* » *Mémoire de Biologie*, Université de Lausanne, 2000.

[49] **Janet** « *Médecine biodynamique* » Site Internet : www.baume.de.vie.fr.

[50] **P. Bussières** « *L'iontophorèse à la dexaméthasone* » Site Internet : www.liquebec.ifrance.com

[51] **A. Bergel, A. Courteix, J. Cantet et M. Comtat** « *Integration des synthèses biochimiques dans des reacteurs electrochimique* » *Lavoisier Tec et Doc*, Paris, vol 7, 1993.

[52] **Q. Luo, H. Wang, X. Zhang, Y. Qian** « *Effect of direct electric current on the cell surface properties of phenol degrading bacteria* » *Applied and Environmental Microbiology*, vol 71, No 1, pp 423-427, 2005.

[53] **D. Eyheramendy** « *Modélisation et calcul scientifique* » site internet : www.univ-lyon1.fr

[54] **R. Perrin** « *Chimie industrielle* » Tome 1, Ed Masson, Paris, 1995.

[55] « *Ressources naturelle de chimie* » site internet : www.educnet.education.fr

[56] **F. Delauche** « *Optimisation du rendement paramétrique de microsysteme (MEMS)* » Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 2003.

[57] **P. Schimmerling** « *Pratique des plans d'expériences* » Ed Technique et Documentation, Paris, 1998.

[58] **P. Ozi** « *Plan d'expériences (DOE), modélisation empirique, méthodologie de la surface de réponse, méthodologie Taguchi* » ENS d'Electrochimie et d'Electrometallurgie, INPG, 1997.

[59] **J. D. Lagrade** « *Initiation à l'analyse des données* » Ed Dunod, Paris, 1983.

[60] **H. Grib, L. Bonnal, J. Sandeaux, R. Sandeaux, C. Gavach et N. Mameri** « *Extraction of amphoteric amino acids by an electromembrane process. pH and electrical state control by electrodialysis with bipolar membranes* » Journal of Chemical technology Biotechnology, vol 73, pp 64-70, 1998.

[61] **M. B. Hall, B. A. Lewis et P. J. Van-Soest, L. E. Chase** « *Simple method for estimation of neutral detergent soluble fiber* » Journal Science and Food Agriculture, vol 4, pp 441-449, 1997.

[62] **J. Aguilera, E. Molina** « *Valorisation nutritive d'un grignon d'olive traité à la soude* » Ann. Zootech, vol 35, No3, pp205-218, 1986.

[63] **A. R. Moss, D.I. Guven et J. M. Everington** « *The effect of sodium hydroxyde treatment on the chemical composition, digestibility and digestible energy content of wheat, barley end straw* » Anim. Feed. Sci. Technol, vol 29, pp73-84, 1990.

[64] **O. I. Susumu, K. Matsuzaki, M. Izuka et M. Taniguchi** « *Effect of steam explosion on enzymatic hydrolysis of palm cake and fiber as solid wastes and natural resources* » Journal of fermentation and bioengineering, vol 77, No 3, pp326-328, 1994.

[65] **L. G. Miller** « *Use of denitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar* » Anal. Chem., vol 31, No 3, pp 426-428, 1959.

[66] **J. E. Bailey et D. F. Ollis** « *Biochemical engineering fundamental* » 2nd Edition, McGraw, New York, 1986.

[67] **A. A. Djakov, V. Yu. Rostovtsev, T. N. Perekhozheva, E. I. Zlokazova, N. N. Oshkanov, V. G. Morozov et V. A. Makhov** « *Electrosorptive technique to deactivate poorly mineralized liquid radioactive waste from NPP* » Proceeding of the ASME/JSME International Conference on Nuclear Engineering, New Orleans, 55-7, 1996.

[68] **H. Lounici** « *Nouveaux procédés de défluoruration des eaux potables- L'électrocogulation et l'électrosorption- Application aux eaux du sahara septentrional algérien* » Thèse de Doctorat d'état, Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, 2002.

1) Dosage de l'azote total par la méthode de KJELDAHL: [2]

La méthode de **KJELDAHL** permet de doser le pourcentage d'azote total dans le matériau traité. Elle s'effectue en trois étapes :

a- Minéralisation : on ajoute à 2g d'échantillon 10ml de H₂SO₄ concentré, chauffer jusqu'à décoloration, poursuivre le chauffage pendant 2 heures.

b- Distillation :

Placer l'extrémité du condenseur dans un Erlen de 150ml d'acide borique à 40% et quelques gouttes du réactif de Thosiro.

Verser le contenu du Matra dans le réservoir de distillation, ajouter quelques gouttes de phénophtaléine ;

Ouvrir le robinet puis rincer le réservoir

Ajouter 23ml de lessive de soude (15N), rincer en prenant soin de ne jamais mettre en contact l'atmosphère avec l'intérieur et surveiller la présence de liquide dans le siphon ;

Ouvrir le robinet de vapeur et distiller pendant 5 mn ;

Enlever l'Erlen et rincer l'extrémité du réfrigérant ;

c- Le titrage :

Titrer avec H₂SO₄ (N/50) jusqu'à coloration rose mauve, le pourcentage de l'azote est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'azote total} = d * V_a * 0.28 / (m_e * 1000) * 100$$

Avec V_a : Volume d'acide ajouté (ml)

m_e : Masse de la prise d'essai

d : Densité de l'échantillon à doser.

$$\% \text{ protéines} = \% \text{ d'azote total} * 6.25.$$

2) Détermination de la cellulose : Méthode de WEENDE :

Par définition et selon la norme ISO-AFNOR (NFV 03040, 1977), l'insoluble «cellulosique » correspond aux substances perdus lors de l'incinération du produit résistant aux attaques successives acide et alcaline.

Principe :

L'échantillon éventuellement dégraissé est titré successivement par solution bouillante d'acide sulfurique et d'hydroxyde de potassium de concentration déterminée. Le résidu est séparé par filtration sur amiante, lavé, pesé et calciné, la perte de poids résultant de la calcination correspond à la cellulose brute de la prise d'essai.

Mode opératoire :

- Peser 0.5g d'échantillon dans des creusets filtrant (P_e), les placer dans l'extracteur avec une température de 100°C , ajouter 50 ml d'acide sulfurique chaud, faire bouillir le mélange pendant 30 mn à une température de 60°C .
- Rincer le tout avec l'eau distillée chaude et refaire la même opération avec le milieu basique (KOH).
- Sécher dans l'étuve à une température de 100°C , laisser refroidir et procéder à la pesée (P_1).
- Passer à la calcination pendant 3 h à une température de 550°C (P_2)
- La différence de poids nous donne la quantité de cellulose existante dans notre échantillon.

$$\text{Cellulose} = [(P_1 - P_2)/P_e] * 100$$

3) Matière grasse :**Mode opératoire :**

Prendre un Erlenmeyer ou un ballon à col rodé et taré (P_1). Y mettre 150 ml d'éther diéthylique.

Peser 3g d'échantillon à l'intérieur d'une cartouche d'extraction puis la faire boucher avec un coton cardé (P_0)

Mettre la cartouche dans l'extracteur qu'on place sous le réfrigérant le tout sur une plaque chauffante à 350°C pendant 4 heures.

Après récupération de l'éther, on place l'Erlenmeyer dans l'étuve à une température de 100°C pendant 1 heure.

Procéder à la pesée (P_e), après refroidissement dans un dessiccateur.

$$\text{MG} = [(P_1 - P_e)/P_0] * 100$$

P_1 : Poids de l'Erlen vide.

P_e : Poids de l'Erlen avec de la matière grasse.

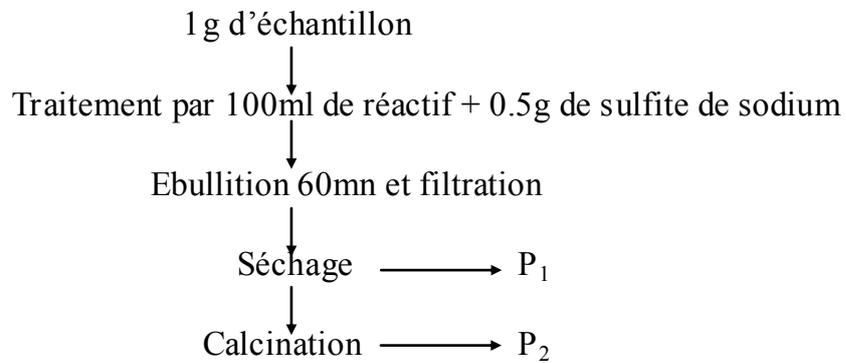
P_0 : Prise d'essai.

4) Méthode de fractionnement de Van-Soest :

Cette technique permet d'isoler successivement trois résidus :

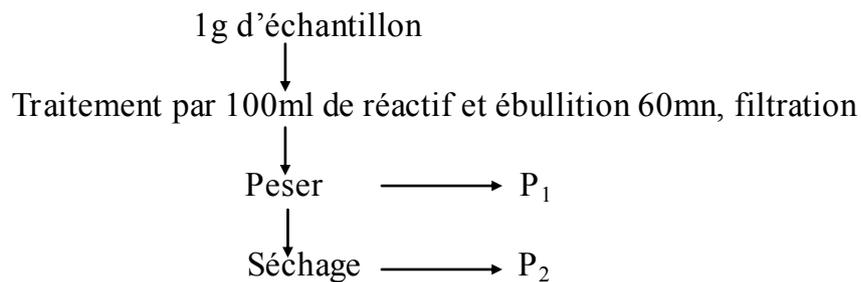
- NDF (neutral detergent fiber) qui constitue l'essentiel de la paroi végétale ;
- ADF (acid detergent fiber) qui correspond à la lignocellulose ;
- ADL (acid detergent lignine) qui correspond à la lignine.

Réactif A : solution de :
 Lauryl sulfate de sodium
 EDTA sel disodique
 Phosphate disodique
 Ethoxyéthanol en milieu aqueux



$$D.N \% = (P_1 - P_2) * 100$$

Réactif B : solution de bromure ethyltrimethylammonium en milieu sulfurique.



$$D.A \% = (P_1 - P_2) * 100$$

5) Matériel et produits utilisés :

Le Tableau N^o17 résume les différents matériels utilisés pour l'élaboration de notre étude.

Tableau N°17 : matériels utilisés

Matériels	Type
Millivoltmètre	Phywe
Générateur	Ley Bold Heraeus
Plaque chauffante+Agitateur	IKAMAG RET
Thermocouple	IKA Staufen
Electrodes	En inox

Les produits utilisés aux cours de nos manipulations sont :

**Pour la solution tampon :*

La solution tampon est constituée d'acide acétique et de l'acétate de sodium 0.05M et pH=5 :

Solution d'acide acétique 0,5M (28,87 ml de CH_3COOH + 1l d'eau distillée).

Solution d'acétate de sodium 0,5M (68g de CH_3COONa ou 122g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + 1l d'eau distillée).

**pour le dosage des sucres réducteurs :*

-Acide dinitrosalicylique

-phénol

-Tartrate double de sodium et de potassium

-La soude

-Sulfite de sodium

6) Dosage des sucres réducteurs :

Cette méthode est basée sur la formation d'un chromatophore entre le réactif DNS et les terminaisons réductrices des molécules des sucres. En effet à température élevée, en milieu basique et en présence des sucres réducteur, le réactif DNS de couleur jaune est réduit en acide 3 Amino-5-nitrosalicylique (brun), et les groupements aldéhydes des sucres sont oxydés en groupements carboxyles.

Réactif DNS :

Acide dinitrosalicylique	1%
Phénol	0.2%
Sulfite de sodium	0.05%
NaOH	1%
Tartrate double de sodium et de potassium	40%

Etalon : Glucose

Les réactifs doivent être mélangés dans l'ordre indiqué ci-dessus à l'exception du tartrate double de sodium et de potassium qui doit être préparé seul et ajouté aux échantillons après ébullition.

Mode opératoire :

Mettre 3 ml d'échantillon convenablement dilué dans un tube à essai, ajouter le réactif DNS, agitez le, et plongez le dans un bain marie bouillant pendant 5mn ajouter 1ml du sel de Rochelle et laissez refroidir. L'échantillon est dosé à 575 nm. Les concentrations des sucres réducteurs sont déterminées par spectrophotométrie d'absorption moléculaire. Le principe de cette méthode repose sur le fait que toute solution colorée traversée par un faisceau de lumière de longueur d'onde spécifique à l'élément recherché, absorbe une fraction de la lumière incidente. La quantité de la lumière absorbée est proportionnelle à la concentration du composé coloré recherché, c'est la loi de BEER-LAMBERT qui s'exprime ainsi :

$$DO = \text{Log } I_0/I = kLC$$

I_0 : intensité faisceau lumineux monochromatique incident.

I : intensité faisceau lumineux

L : épaisseur de la cuve (1cm).

K : coefficient d'extinction moléculaire.

C : concentration du corps absorbant dans la solution.

DO : densité optique lue directement sur le spectrophotomètre.

Les densités optiques sont converties en concentration au moyen d'une courbe d'étalonnage établie préalablement (Figure N° 27).

Cela nous permettra de tracer la courbe de l'évolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps et de calculer le rendement d'hydrolyse.

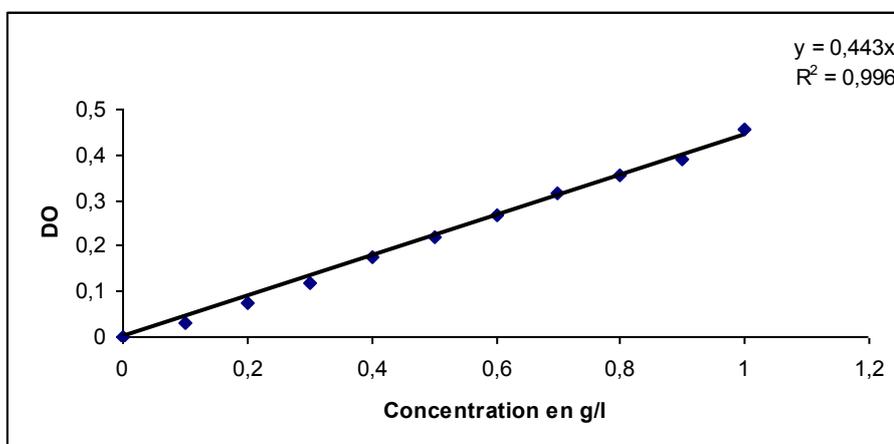
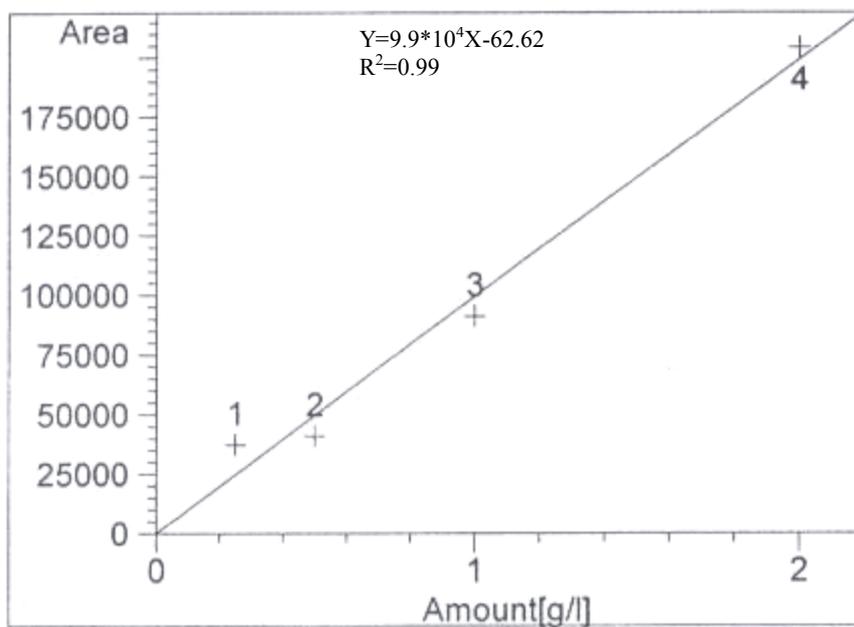
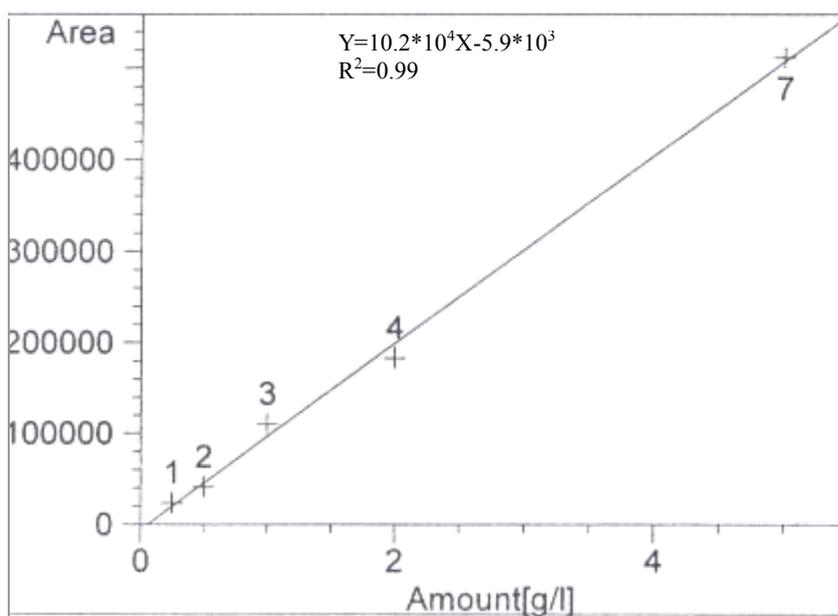


Figure N°27 : Evolution de la densité optique en fonction de la concentration des sucres réducteurs.

7).a- Dosage du glucose par HPLC :**Figure N⁰28 : Courbe d'étalonnage du glucose****7).b- Dosage du cellobiose par HPLC :****Figure N⁰29 : Courbe d'étalonnage du cellobiose.**

8)- Evolution de la concentration des sucres réducteurs et du rendement d'hydrolyse en fonction du temps :

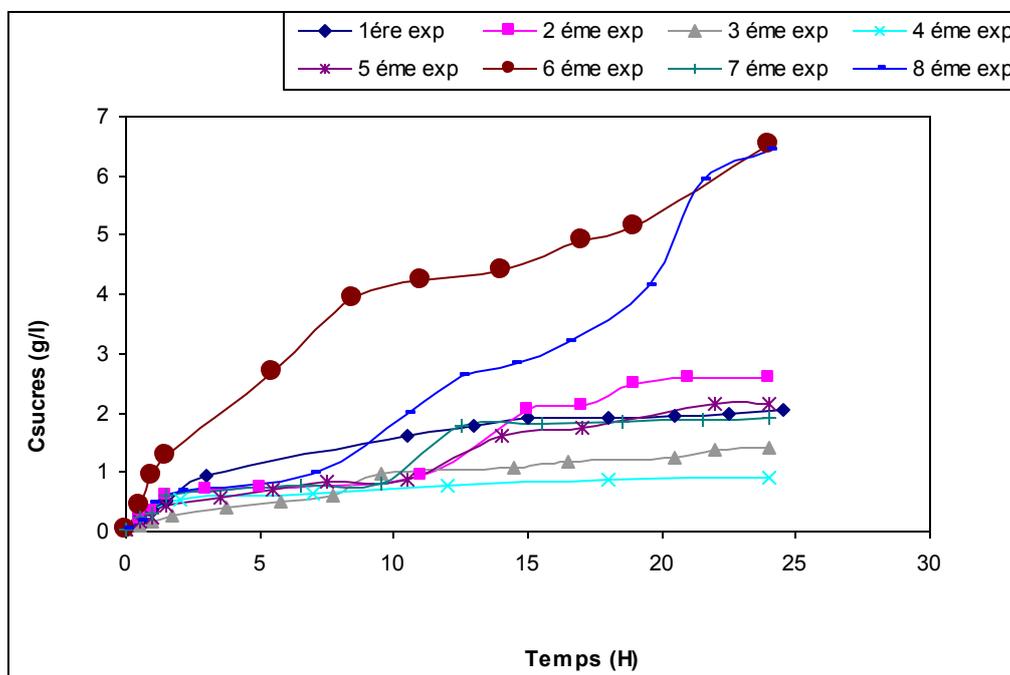


Figure N°30 : Evolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps.

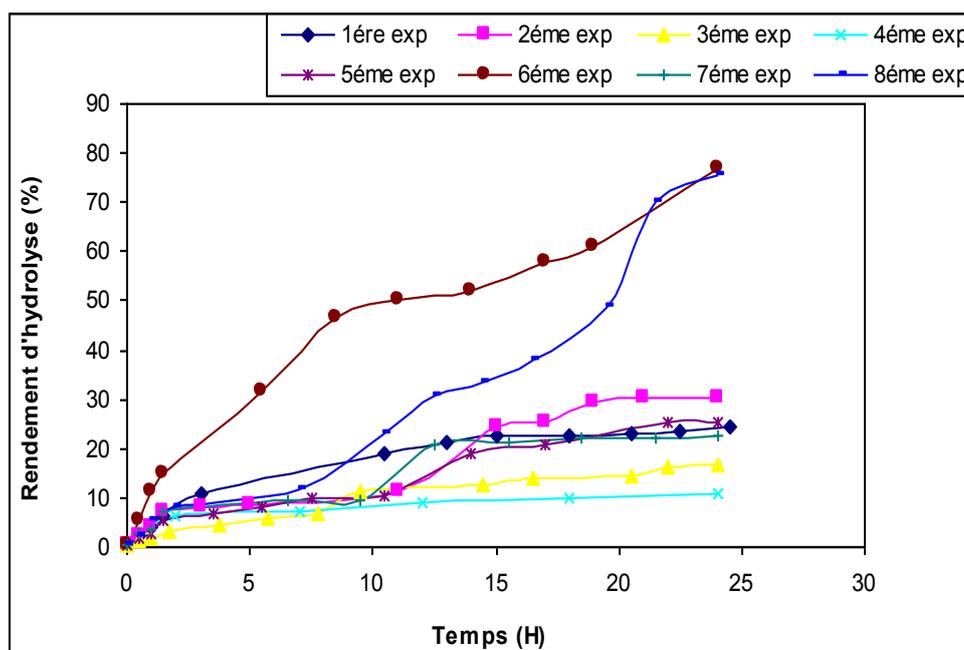


Figure N°31 : Evolution du rendement des sucres réducteurs en fonction du temps.

