

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE D'ALGER

Département de Génie de l'Environnement



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
Ecole Nationale Polytechnique



**Laboratoire des Biotechnologies Environnementales
& de Génie des Procédés (BIOGEP)**

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

En Génie de l'Environnement

Présentée par

ABDI-HAIDER Nadia

T H E M E

**VALORISATION DE REJETS SOLIDES
D'INDUSTRIES AGROALIMENTAIRES PAR
VOIE ENZYMATIQUE**

Soutenue le : 11 Décembre 2005

devant le jury composé

R. KERBACHI

Professeur ENP, Alger

Président

N. MAMERI

Professeur ENP, Alger

Rapporteur

M.M. BELLAL

Professeur INA, Alger

Examineur

A. PAUSS

Professeur, UTC, Compiègne

Examineur

T. AHMED ZAID

Maître de Conférences, ENP

Examineur

A. S. MERAD

Maître assistant

Invitée

ANNEE 2004 - 2005

LISTE DES ABREVIATIONS

B.S.A :	Bovine Serum Albumine
C₀ :	Concentration du soluté avant la traversée de la membrane (mg/l)
C :	Concentration de la solution à ultrafiltrer (g/l)
C_f :	Concentration du flux d'entrée (g/l)
C_m :	Concentration de soluté à la surface de la membrane (g/l)
C_p :	Concentration du soluté dans le perméat (g/l)
C_r :	Concentration du retentât (g/l)
D :	Diffusivité locale du soluté (m ² /s)
dC/dx :	Gradient de concentration du soluté (kg/m ³ /m)
E :	Enzyme
e :	Epaisseur de la membrane (m)
FPH :	Fish protéins hydrolysate
HPLC :	Chromatographie liquide haute performance
J :	Densité du flux de solvant (m ³ /m ² /s)
J_v :	Flux du perméat (l/h.m ²)
K :	Coefficient de transfert de matière
K_m :	Constante de Michaelis-Menten (g/l)
L_p :	Perméabilité à l'eau (l/h.m ² .bar)
L_{p0} :	Perméabilités à l'eau de la membrane avant ultrafiltration(l/h.m ² .bar)
L_{p1} :	Perméabilités à l'eau de la membrane après ultrafiltration(l/h.m ² .bar)
M.A.T :	Matières azotées totales.
M₁ :	Poids humide de la muqueuse (g)
M₂ :	Poids sec de la muqueuse après 24h de séchage à 105°C (g)
N :	Nombre de pores par unité de surface.
P_C :	Pompe de recirculation.
P_e :	Pression d'entrée (bar)
P_s :	Pression de sortie (bar)
Phe:	Phénylalanine
ΔP :	Pression transmembranaire moyenne (bar).
Q_p :	Débit du perméat (l/h)
Q_r :	Débit du retentât (l/h)
Q_f :	Débit du flux d'entrée(l/h).
R :	Taux de rejet (%)

R_C :	Résistance due au colmatage de la membrane et éventuellement au gel (m ⁻¹).
R_m :	Résistance de la membrane propre (m ⁻¹)
r_p :	Rayon moyen des pores (m)
S :	Substrat
-Tryp :	Tryptophane
Tyr :	Tyrosine
U :	Vitesse de recirculation (m/s)
V_m :	Vitesse maximale d'hydrolyse enzymatique (m/s)
V_p :	Volume du perméat (l)
X :	Poids sec (%)
δ :	Epaisseur de la couche de polarisation (m).
μ :	Viscosité dynamique (Pa/s).

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 :	<i>Schéma représentatif d'un processus d'hydrolyse enzymatique Classique.....</i>	7
Figure 1.2 :	<i>Evolution du flux de perméat en fonction de la pression.....</i>	14
Figure 1.3 :	<i>Modèle du film.....</i>	15
Figure 1.4 :	<i>Evolution de l'activité de la muqueuse en fonction de la durée d'incubation sur le substrat BSA.....</i>	22
Figure 1.5 :	<i>Evolution de l'activité de la muqueuse d'estomac de mouton à différents pH pendant la durée de conservation. Substrat BSA.....</i>	23
Figure 1.6 :	<i>Évolution de l'activité enzymatique sur la BSA en fonction de la Température.....</i>	24
Figure 1.7 :	<i>Evolution de l'activité enzymatique sur le rejet de poissonnerie en fonction de la température.....</i>	25
Figure 1.8 :	<i>Evolution de l'activité enzymatique sur le substrat BSA en fonction du pH.....</i>	26
Figure 1.9 :	<i>Evolution de l'activité enzymatique sur le rejet de poissonnerie en fonction du pH.....</i>	26
Figure 1.10 :	<i>Evolution du rendement d'hydrolyse à différents rapports Enzyme- Substrat (g/g).....</i>	27
Figure 1.11 :	<i>Variation du taux d'hydrolyse en fonction du rapport eau/ substrat.....</i>	28
Figure 1.12 :	<i>Cinétique d'hydrolyse des protéines de poisson par la pepsine brute....</i>	29
Figure 1.13 :	<i>Représentation de $1/V$ en fonction de $1/P_0$.....</i>	29
Figure 1.14 :	<i>Schéma du réacteur biologique.....</i>	30
Figure 1.15 :	<i>Essai d'hydrolyse à l'échelle semi-pilote.....</i>	31
Figure 1.16 :	<i>Evolution du rendement d'hydrolyse avec et sans agitation.....</i>	32
Figure 1.17 :	<i>Représentation schématique du processus d'Ultrafiltration.....</i>	33
Figure 1.18 :	<i>Ultrafiltration de l'hydrolysât à concentration constante</i>	35
Figure 1.19 :	<i>Evolution du flux du perméat et du taux de rejet.....</i>	38
Figure 2.1 :	<i>Production mondiale d'huile d'olive.....</i>	45
Figure 2.2 :	<i>Processus de production d'huile d'olive.....</i>	46

Figure 2.3 :	<i>Composition physique de l'olive.....</i>	47
Figure 2.4 :	<i>Effet du degré de délignification sur la vitesse d'hydrolyse.....</i>	51
Figure 2.5 :	<i>Effet de la température dans le prétraitement alcalin sur la concentration en sucre réduit.....</i>	61
Figure 2.6 :	<i>Effet du rapport R sur la concentration en sucre réduit.....</i>	62
Figure 2.7 :	<i>Effet du pH sur l'activité de l'enzyme.....</i>	63
Figure 2.8 :	<i>Effet de la température sur l'activité de l'enzyme.....</i>	63
Figure 2.9 :	<i>Variation de l'activité résiduelle de l'enzyme à différentes valeurs de la Température.....</i>	64
Figure 2.10 :	<i>Effet du prétraitement alcalin sur le rendement de saccharification.....</i>	65
Figure 2.11a :	<i>Effet du rapport E/S sur la concentration en sucre réduit.....</i>	66
Figure 2.11b :	<i>Variation du rendement de saccharification en fonction de E/S.....</i>	67
Figure 2.11c :	<i>Effet de E/S sur le rendement en glucose.....</i>	67
Figure 2.11d :	<i>Représentation double inverse de Lineweaver-Burk.....</i>	68
Figure 2.12 :	<i>Effet des produits résultants de la réaction enzymatique sur l'inhibition de la saccharification du grignon d'olive.....</i>	69
Figure 3.1 :	<i>Schéma du bioréacteur continu à membrane.....</i>	72
Figure 3.2 :	<i>Activité enzymatique résiduelle dans la solution concentrée et dans le Perméat.....</i>	74
Figure 3.3 :	<i>Perméabilité solvant- membrane avant et après ultrafiltration.....</i>	75
Figure 3.4 :	<i>Variation du flux du perméat avec la pression transmembranaire à différentes vitesses.....</i>	76
Figure 3.5a :	<i>Influence de U sur le rendement de saccharification.....</i>	77
Figure 3.5b :	<i>Variation du flux du perméat durant la saccharification enzymatique à différentes vitesses.....</i>	78
Figure 3.5c :	<i>Influence de U sur la productivité instantanée.....</i>	79
Figure 3.6a :	<i>Effet de la pression transmembranaire (ΔP) sur le rendement de Saccharification.....</i>	80
Figure 3.6b :	<i>Influence de ΔP sur la concentration en glucose produite.....</i>	81
Figure 3.6c :	<i>Variation du flux du perméat pendant la saccharification enzymatique à différentes pressions.....</i>	81

Figure 3.7a :	<i>Variation de la concentration en sucre réduit à différentes valeurs du rapport E/S.....</i>	82
Figure 3.7b :	<i>Représentation de Lineweaver-Burk.....</i>	83
Figure 4.1 :	<i>Schéma du bioréacteur discontinu couplée à un champ électrique.....</i>	91
Figure 4.2a :	<i>Influence du champ électrique sur l'hydrolyse du grignon d'olive par <i>Trichoderma reesei</i>.....</i>	94
Figure 4.2b :	<i>Rendement de saccharification.....</i>	95
Figure 4.3a :	<i>Influence du champ électrique sur la saccharification du grignon d'olive...</i>	96
Figure 4.3b :	<i>Influence du champ électrique sur le rendement de saccharification.....</i>	97
Figure 4.3c :	<i>Evolution du rendement de saccharification en fonction du potentiel.....</i>	98
Figure 4.3d :	<i>Taux d'amélioration du rendement apporté par le champ électrique en fonction de la valeur appliquée.....</i>	98
Figure 5.1 :	<i>Représentation dans un espace à trois facteurs d'un plan composite centré complet. En noir figurent les points en étoile et en blanc les points du plan factoriel.....</i>	102
Figure 5.2 :	<i>Schéma du bioréacteur discontinu.....</i>	103
Figure 5.3 :	<i>Effet du pH sur l'activité de l'enzyme;.....</i>	104
Figure 5.4 :	<i>Effet de la température sur l'activité de l'enzyme.....</i>	104
Figure 5.5 :	<i>Evolution du taux de saccharification en fonction de l'inverse de la concentration en substrat.....</i>	105
Figure 5.6 :	<i>Schéma du bioréacteur continu à membrane.....</i>	105
Figure 5.7 :	<i>Variation du rendement de saccharification avec la température à différentes vitesses transmembranaires.....</i>	106

Figure 5.8 : *Variation du rendement de saccharification avec le pH à différentes vitesses transmembranaires*107

Figure 5.9 : *Variation du rendement de saccharification avec la température à différentes valeurs du pH, vitesse optimale de recirculation*..... 107

Figure 5.10 : *Evolution du taux de saccharification en fonction de $1/S$ à différentes vitesses transmembranaires*.....108

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE 1

Tableau 1.1 : <i>Principales protéases</i>	9
Tableau 1.2 : <i>Résultats des tests microbiologiques du rejet solide de la poissonnerie de Dellys</i> ...	20
Tableau 1.3: <i>Composition moyenne annuelle du rejet solide de la poissonnerie de Dellys</i>	21
Tableau 1.4 : <i>Concentrations d'acides aminés dans l'hydrolysât</i>	39

PARTIE 2 VOLET 1

Tableau 2.1 : <i>composition chimique moyenne de l'olive en % de matière sèche</i>	48
Tableau 2.2 : <i>Composition chimique du résidu solide de moulin d'huile avant et après traitement à la soude NaOH</i>	58

PARTIE 2 VOLET 3

Tableau 4.1 : <i>Composition chimique du résidu solide avant et après traitement à NaOH</i> ...	92
---	----

PARTIE 2 VOLET 4

Tableau 5.1 : <i>Niveaux des facteurs (En mode discontinu)</i>	110
Tableau 5.2 : <i>Niveaux des facteurs (En mode continu)</i>	110
Tableau 6.1 : <i>Structure du plan d'expériences Cas discontinu</i>	111
Tableau 6.2 : <i>Structure du plan d'expériences Cas continu</i>	112
Tableau 6.3 : <i>Tableau des réponses expérimentales et valeurs réduites. Cas discontinu</i>	113
Tableau 6.4 : <i>Tableau des réponses expérimentales et valeurs réduites. Cas continu</i>	114
Tableau 7.1 : <i>Détermination des coefficient du modèle en discontinu avec interaction des paramètres</i>	115
Tableau 7.2 : <i>Statistiques de la régression du modèle</i>	115
Tableau 7.3 : <i>Détermination des coefficients du modèle en discontinu sans interactions des paramètres</i>	116
Tableau 7.4 : <i>Statistiques de la régression du modèle</i>	116
Tableau 7.5: <i>Détermination des coefficients du modèle avec interactions</i>	117
Tableau 7.6 : <i>Statistiques de la régression du modèle</i>	117
Tableau 7.7: <i>Détermination des coefficients du modèle sans interaction</i>	118
Tableau 7.8 : <i>Statistiques de la régression du modèle</i>	118

Avant - Propos

Ce présent travail a été réalisé au Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des procédés (BIOGEP) de l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, sous la direction de Monsieur le Professeur N. Mameri. Il m'est agréable de lui exprimer ici le témoignage de ma profonde gratitude pour son aide, son attention et l'intérêt qu'il a accordé à ce travail, ses encouragements incessants les conseils avisés qu'il n'a cessé de me prodiguer tout au long de cette étude. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur R. KERBACHI qui a bien voulu accepter de présider le jury.

Je remercie, Monsieur M.M. BELLAL, Professeur à l'INA, Alger ; Monsieur A. PAUSS, Professeur à l'UTC, Compiègne et Monsieur T. AHMED-ZAID, Maître de Conférences à l'ENP, Alger et Madame A. S. MERAD, Chef du Service Anaérobies de l' I.P.A pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu accorder à mon travail en me faisant l'honneur d'accepter de faire partie du jury.

Je veux exprimer aussi ma gratitude à tous mes collègues D. Belhocine, H. Lounici, H. Grib, M. Drouiche, M.S. Benhabilès, R. Bouarab, L. Adour, et O. Yahiaoui pour leur concours amical et leurs contacts chaleureux

Enfin, je tiens à remercier tous ceux, étudiants en post-graduation, personnels de l'Ecole, en particulier Madame H. BOUAM, secrétaire au sein du département du Génie de l'Environnement.

Sommaire

INTRODUCTION.....	3
PARTIE 1: HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS DE POISSONNERIES	
1. Introduction	5
2. Principaux procédés de concentration des protéines de poisson.....	6
2.1 Hydrolyse enzymatique.....	6
2.1.1 Autolyse.....	8
2.1.2 Hydrolyse exogène.....	8
2.2 La pepsine.....	9
3.L'ultrafiltration.....	10
3.1 Principe de l'ultrafiltration.....	10
3.2 Les membranes d'ultrafiltration.....	10
3.3 Les différents procédés d'ultrafiltration.....	11
3.4 Les modèles d'ultrafiltration.....	13
3.4.1 Modèle du tamis moléculaire.....	13
3.4.2 Modèle du film.....	15
3.4.3 Modèle osmotique.....	16
3.5 Colmatage des membranes.....	17
4. Partie expérimentale	18
4.1 Préparation de l'enzyme brute.....	18
4.2 Etude du rejet.....	19
4.2.1 Prélèvement.....	19
4.2.2 Analyses microbiologiques.....	20
4.2.3 Analyses chimiques.....	21
4.3 Hydrolyse des rejets de poissonneries.....	21
5. Résultats et discussion.....	22
5.1 Activité de la pepsine préparée.....	22
5.2 Optimisation de l'activité enzymatique.....	23
5.2.1 Influence de la température et du pH sur l'activité enzymatique.....	24
5.2.2 Etude de l'hydrolyse enzymatique pepsine rejet de poissonnerie.....	27
5.3 Essai en semi pilote et couplage à l'ultrafiltration.....	30
5.3.1 Description de l'installation et mode opératoire.....	30
6. Conclusion	40
Références bibliographiques.....	41

PARTIE 2 VOLET 1 : PRODUCTION DES SUCRES FERMENTESCIBLES A PARTIR DU GRIGNON D'OLIVE

1. Introduction.....	44
2. Généralités sur l'olive et ses sous produits	45
2.1 Origine et production.....	45
2.2 Technologie de production d'huile d'olive.....	46
2.3 Composition de l'olive.....	47
2.4 Estimation quantitative des rejets d'huilerie d'olive.....	48
3. Les résidus lignocellulosiques.....	48
3.1 Composition des résidus lignocellulosiques.....	49
3.1.1 La cellulose.....	49
3.1.2 Les hémicelluloses	49
3.1.3 Les lignines.....	49
3.2 Nature de la résistance structurale des constituants pariétaux.....	50
3.2.1 Effet de la structure de la cellulose sur l'hydrolyse.....	50
3.2.2 Effet de la structure de la lignine sur l'hydrolyse.....	50
4. Les prétraitements.....	51
4.1 Les différentes méthodes de prétraitement.....	52
4.1.1 Les prétraitements physiques.....	52
4.1.2 Les prétraitements chimiques.....	53
4.1.3 Les prétraitements biologiques.....	54
5. Hydrolyse enzymatique des résidus lignocellulosiques	55
5.1 Les enzymes cellulolytiques.....	55
5.1.1 L'endo-glucanase (1-4- β -D-glucane glucohydrolase : E.C.3.2.14).....	56
5.1.2 L'exo-glucanase (1-4- β -D-glucane cellobiohydrolase :E.C.3.2.91).....	56
5.1.3 Cellobiase (β -D glucoside-glucohydrolase E.C.3.2.21).....	56
5.2 La régulation enzymatique.....	57
6. Matériels et méthodes	57
6.1 Enzyme et substrat.....	57
6.2 Méthodes analytiques.....	59
7. Résultats et discussion.....	60
7.1 Prétraitement du résidu brute.....	60
7.2 Optimisation de la saccharification enzymatique du résidu solide.....	62
8. Conclusion.....	70

PARTIE 2 VOLET 2 : HYDROLYSE ENZYMATIQUE D'UN REJET D'HUILERIE DANS UN REACTEUR A MEMBRANE

1. Introduction.....	71
2. Bioréacteur à membrane continu	72
3. Méthodes analytiques.....	73
4. Résultats et discussion.....	74
4.1 Rejet d'enzyme de la membrane.....	74
4.2 Influence des paramètres hydrauliques sur le flux du perméat avec un recyclage total du perméat.....	76
4.3. Influence des paramètres hydrodynamiques sur le rendement de saccharification et sur la productivité instantanée.....	77
4.4 Effet du rapport de la masse d'enzyme à la masse initiale de substrat (E/S) sur la performance du bioréacteur continu à membrane.....	82
5. Conclusion.....	84
Références bibliographiques.....	85

PARTIE 2 VOLET 3 : AMELIORATION DES PERFORMANCES DE LA SACCHARIFICATION ENZYMATIQUE DU GRIGNON D'OLIVE PAR UTILISATION D'UN CHAMP ELECTRIQUE

1. Introduction.....	90
2. Matériels et méthodes.....	90
2.1 Bioréacteur.....	90
2.2 Enzyme et substrat.....	92
2.3 Méthodes analytiques.....	93
3. Résultats et interprétation.....	93
3.1 Faisabilité du couplage Bioréacteur/ champ électrique.....	93
3.2 Optimisation de l'influence du champ électrique sur la saccharification du grignon d'olive	95
4. Conclusion.....	99
Références bibliographiques.....	100

**PARTIE 2 VOLET 4 : UTILISATION DES PLANS D'EXPERIENCES
POUR DETERMINER LA ROBUSTESSE DE L'HYDROLYSE
ENZYMATIQUE AU POINT DE FONCTIONNEMENT OPTIMUM**

1. Introduction.....	101
2. Plan d'expériences utilisé	101
2.1 Choix du type de plan.....	101
3. Réalisation expérimentale en mode discontinu.....	103
3.1Appareillage utilisé.....	103
4. Réalisation expérimentale en mode continu.....	105
4.1Appareillage utilisé.....	105
5. Présentation des facteurs contrôlés du modèle en mode discontinu et en mode continu.....	108
6. Plan d'expérimentation.....	111
7. Résultats.....	115
8. Conclusion.....	118
Références bibliographiques.....	119
CONCLUSION GENERALE.....	120

INTRODUCTION GENERALE

Au cours des 20 dernières années, il y a eu de nombreuses tentatives de valorisations de ressources protéiques jusqu'alors totalement ignorées. Plusieurs substrats protéiques furent étudiés ; parmi elles, les protéines de soja, la caséine, le lactosérum, le sang et les protéines de poissons.

L'hydrolyse enzymatique de ces dernières, génère un concentré protéique à haute valeur ajoutée. Ce produit final appelé FPH « Fish Protein Hydrolysate » est caractérisé par une amélioration de sa valeur nutritionnelle et par d'excellentes propriétés fonctionnelles incluant une grande solubilité, un bon pouvoir émulsifiant et de bonnes propriétés moussantes [1]

Le but de notre étude est de valoriser un résidu protéique solide de rejets de poissonneries et un matériel lignocellulosique "le grignon d'olive", résidu solide des rejets d'huilerie. Pour ce faire, nous avons produit par le biais de la voie enzymatique à partir de ces résidus des produits à valeur ajoutée, à savoir, des peptides et acides aminés dans le cas des rejets de poissonnerie et, des sucres dans le cas du grignon d'olive.

Plusieurs étapes ont régi nos recherches :

1. Pour les rejets de poissonneries :

- La préparation d'une enzyme brute à partir de l'estomac du mouton.
- Par le biais d'expériences, nous avons déterminé les conditions optimales de l'activité de l'enzyme (température, concentration, pH) sur un substrat standard et sur des protéines de poissons
- La mise en œuvre à l'échelle pilote du processus enzymatique en vue d'hydrolyser les longues chaînes polypeptidiques et ainsi libérer les acides aminés afin d'obtenir un concentré protéique de haute valeur nutritive.
- Le couplage des deux techniques : hydrolyse enzymatique et ultrafiltration en vue de réaliser l'opération de concentration

2. Pour les rejets d'huileries :

- Effet du prétraitement alcalin des grignons d'olives sur le rendement de saccharification

- Optimisation de l'hydrolyse enzymatique dans un bioréacteur en mode discontinu en présence d'une cellulase commerciale : l'enzyme de *Trichoderma reesei*
- Optimisation de l'hydrolyse enzymatique après couplage à un ultrafiltre
- Comparaison des deux procédés continu et discontinu (rendement de saccharification, inhibitions).
- Amélioration des performances de la saccharification enzymatique du grignon d'olive par utilisation d'un champ électrique.
- Une modélisation du phénomène a été étudiée par le biais de plans d'expérience utilisant un modèle polynomial de degré 2 au moins, connu sous le nom de plan composite centré pour déterminer les effets non négligeables et les interactions importantes entre les différents facteurs étudiés.

PARTIE 1

HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS DE POISSONNERIES

1. Introduction

L'utilisation des rejets de poissonnerie comme source de protéines et d'acides aminés essentiels de haute valeur nutritionnelle a été appliquée cette dernière décennie [2-5]. La production mondiale de la pêche est de l'ordre de 3 millions de tonnes de poissons. Sachant que les 25 % de cette production sont considérés non comestibles tout en étant de valeur nutritionnelle sensiblement identique aux parties comestibles ; leur revalorisation conduit à obtenir un produit peu coûteux, pauvre en lipides, de haute valeur nutritive, de goût agréable, stable et de longue conservation [6]. C'est dans ce cadre que vient s'inscrire notre travail. Il consiste à valoriser des rejets solides de poissonneries par hydrolyse enzymatique en présence de pepsine. Le choix de la pepsine comme enzyme protéolytique est justifié par le fait de sa grande spécificité d'hydrolyse des polypeptides et son bas pH optimum nécessaire à son activité enzymatique, minimisant ainsi toutes contaminations bactériennes. Toutefois, son prix de vente assez élevé pourrait s'avérer être un obstacle à la faisabilité économique du procédé. De ce fait, il a été décidé dans un premier temps, de nous intéresser à la production d'une pepsine brute à partir de l'estomac du mouton et de déterminer les conditions optimales de son activité enzymatique (température, concentration et pH) sur un substrat standard et sur des protéines de poissons. Dans une deuxième étape, aux conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme nous avons mis en œuvre l'hydrolyse enzymatique à l'échelle pilote dans un réacteur agité fonctionnant en cuvée. Enfin, le couplage du réacteur enzymatique à un ultrafiltre a été réalisé et l'optimisation de ce procédé fonctionnant en mode continu a été menée. La comparaison des deux procédés continu et discontinu sera présentée.

2. Principaux procédés de concentration des protéines de poisson

Au cours des vingt dernières années il y a eu de nombreuses tentatives de valorisation des rejets solides de poissonneries et des espèces non comestibles pour produire des aliments de haute qualité nutritionnelle. Les premiers procédés utilisés comme l'hydrolyse chimique et l'extraction par solvant organique ont donné des résultats peu concluants en termes de qualité nutritionnelle des protéines obtenues et conservation de certains acides aminés [9] [10].

Cette dernière décennie, une fulgurante progression de l'application des procédés biologiques, plus particulièrement les procédés enzymatiques, a été constatée [4-7] [8].

Nous nous contenterons de présenter la technique d'hydrolyse enzymatique qui est le principal thème de ces travaux de recherche.

2.1 Hydrolyse enzymatique

Une enzyme est un catalyseur biologique de nature protéique complexe activant spécifiquement la transformation d'un substrat ou d'une classe de substrats [11]. Le site actif d'une enzyme est une région localisée où se fixe et se transforme le substrat.

L'hydrolyse enzymatique est une méthode qui consiste en l'utilisation d'une enzyme déterminée, ou plus fréquemment, d'un mélange d'enzymes pouvant solubiliser les protéines et libérer les lipides. Le produit final est une protéine fonctionnelle pouvant être immédiatement commercialiser comme additif solide pour l'alimentation humaine ou animale [12-13]. Le produit final obtenu après hydrolyse est appelé "F.P.H." (Fish Protein Hydrolysate).

A titre d'exemple, nous présentons sur la figure 1.1 un processus d'hydrolyse enzymatique des protéines de poissons.

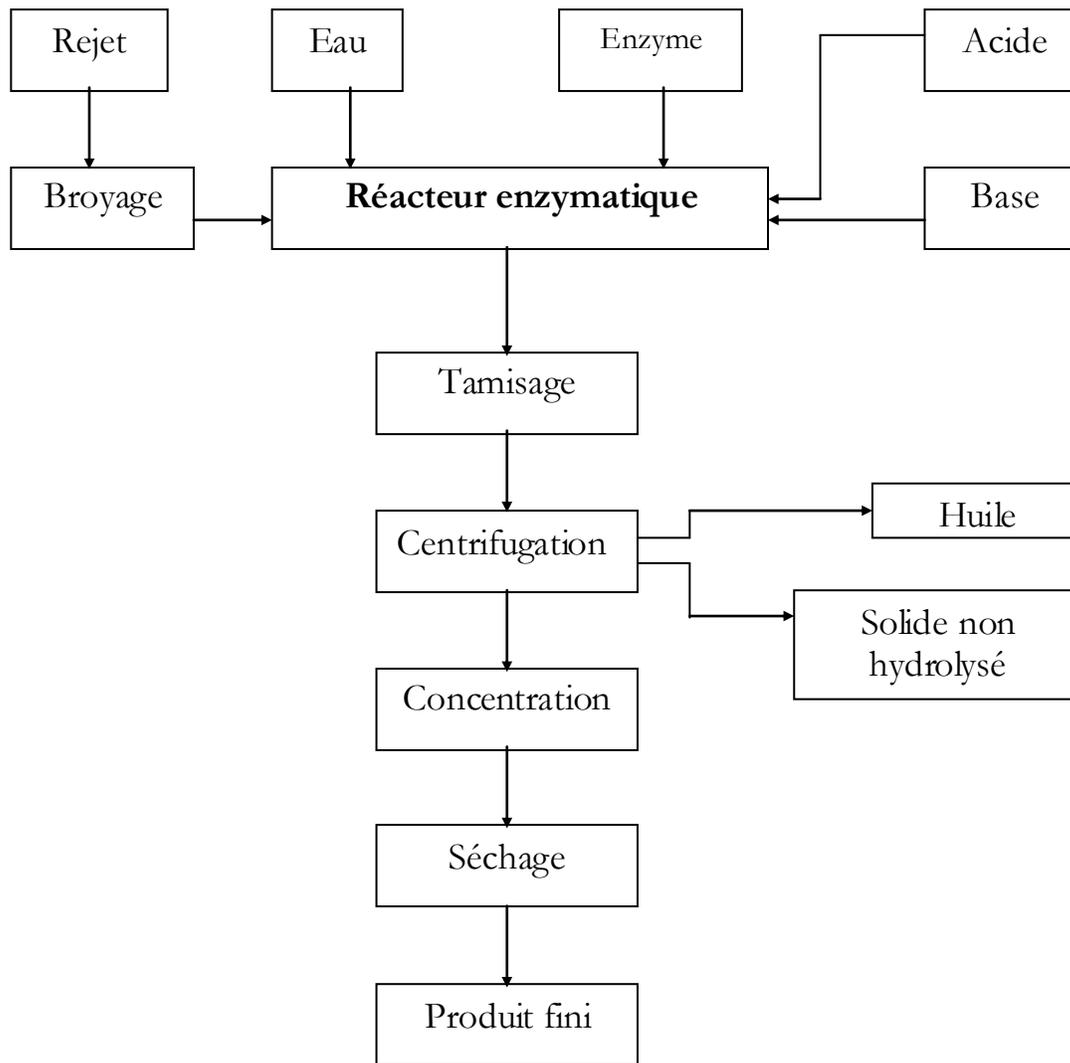


Figure1.1: Schéma représentatif d'un processus d'hydrolyse enzymatique classique [14]

Dans le réacteur enzymatique, le poisson broyé est mélangé avec une quantité d'eau bien déterminée et, ensuite homogénéisé par simple agitation. Le pH désiré est ajusté par ajout d'acide ou de base concentrée. A ce moment, l'enzyme est ramenée aux conditions optimales d'hydrolyse et, est ajoutée en quantité bien déterminée par rapport au mélange eau poisson. Un excellent mixage est maintenu jusqu'à la fin de la réaction.

Quand le taux d'hydrolyse désiré est atteint, la réaction est stoppée par désactivation thermique de l'enzyme qui se fait généralement à une température comprise entre

80°C et 100°C. De plus, cette étape éliminera l'humidité et concentrera l'hydrolysât à environ 70% en solide [15].

La réaction d'hydrolyse est suivie de l'opération de tamisage grossier, il consiste à retenir les arêtes et les écailles.

Le séchage peut avoir un large effet sur le produit final. Le séchage par pulvérisation est le meilleur choix pour ce type de produit car il minimise la perte des nutriments, augmente la réhydratation et tend à blanchir le produit. Ce type de séchage, n'est cependant, pas économique avec un liquide dont le revenu solide est moins de 30%. Il convient donc, de concentrer d'abord la fraction protéique liquide. L'étape de concentration doit aussi minimiser les pertes nutritionnelles, en évitant les hautes températures et les longues durées [16], Il apparaît ainsi, que l'utilisation de l'ultrafiltration dans le cadre de ces travaux en tant qu'opération finale de concentration est un choix judicieux au vu qu'elle répond aux critères préalablement cités.

2.1.1 Autolyse

L'autolyse est une hydrolyse enzymatique sans addition d'enzyme c'est à dire que le système enzymatique, responsable de la réaction est, déjà contenu dans le poisson ; en particulier dans les viscères. Ce phénomène est facilement réalisable grâce à l'action enzymatique des boyaux qui s'étend à travers la masse de poisson broyé [17]. L'autolyse aboutit à une phase aqueuse contenant énormément de protéines, de lipides et à un sédiment insoluble de protéines non hydrolysées. [18-19]. L'autolyse n'est cependant jamais complète, même après des incubations de quelques mois [20][21]. Le second grief retenu contre l'autolyse est le fait de ne pas pouvoir contrôler les propriétés des produits obtenus (c'est à dire la longueur des chaînes des peptides de l'hydrolysât) [22- 23].

2.1.2 Hydrolyse exogène

Pour pallier à la limite du contrôle de la propriété des produits d'hydrolysât obtenus lors de l'autolyse, il a été fait de plus en plus appel aux enzymes commerciales exogènes de diverses origines [24][27]. Ces dernières, suivant leur nature peuvent produire des substances désirées en vue d'une valorisation des rejets de poissonnerie. Sur le tableau 1, nous présentons les principales protéases de diverses origines ainsi que les conditions optimales de leurs activités.

Tableau 1.1 : Principales protéases [28].

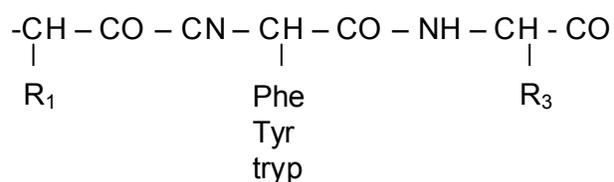
Classe et nom de l'enzyme	Micro-organismes producteurs ou origine	Conditions optimales		
		pH	T(°C)	
Protéase à Sérine				
Chymotrypsine	Pancréas	8,5	35	
Trypsine	Pancréas	8,5	45	
Protéase de B. subtilis	Bacillus subtilis	10,0	65	
Protéase à Cystéine				
Papaïne	Carica papaya	6,0	65	
Chymopapaïne	Carica papaya	6,0	65	
Bromlaïne	Ananas cosmosus	6,5	55	
Protéase acide	Pepsine	Estomac	1,8	40
	Chymosine	Abomassum	4,8	40

Enfin comme nos travaux ont porté sur la pepsine, nous allons présenter avec détails cette protéase dans le paragraphe suivant.

2.2 La pepsine

C'est l'une des enzymes les plus anciennement connues résultant de l'activation d'un proenzyme inactif, le pepsinogène de poids moléculaire 40000 daltons. Elle est synthétisée dans la muqueuse gastrique, en éliminant 42 résidus d'acides aminés du proenzyme, son poids moléculaire est ainsi de 3300 [29].

Elle hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques dans lesquelles un résidu d'acide aminé aromatique (Phe, Tyr, Tryp) est impliqué par son groupement carboxylique selon le schéma suivant [30] :



De plus, elle hydrolyse lentement les liaisons peptidiques impliquant les résidus suivants : Leucine et Valine. On distingue trois types de pepsines :

- Pepsine A : hydrolyse les liaisons peptidiques de préférence au niveau de la phénylalanine et leucine ;
- Pepsine B : ayant une spécificité plus étroite que A, dégradation plus faible de la gélatine et de l'hémoglobine ;
- Pepsine C : haute activité vis à vis de l'hémoglobine.

3. L'ultrafiltration

Les techniques membranaires sont des procédés utilisant une membrane pour la séparation des composants d'un fluide. Elles sont avantageuses du point de vue énergie, rapidité et économie. Elles apportent un moyen de purification efficace sans générer de pollutions supplémentaires.

Les techniques à membranes les plus utilisées sont la microfiltration, l'ultrafiltration, l'osmose inverse, l'électrodialyse et la dialyse.

3.1 Principe de l'ultrafiltration

L'ultrafiltration est un procédé membranaire permettant la séparation de macromolécules en phase liquide par perméation à travers une membrane semi-perméable sous l'action d'un gradient de pression [37-38].

L'ultrafiltration d'une solution génère deux effluents:

- Le retentât : Il contient toutes les grosses molécules qui ne peuvent pas traverser les pores de la membrane ;
- Le perméat : Il est composé du soluté et des particules à faible poids moléculaire inférieur au seuil de coupure de la membrane.

3.2 Les membranes d'ultrafiltration

La membrane constitue l'élément essentiel des techniques de séparation membranaires en général et de l'ultrafiltration en particulier [39]

Les membranes permselectives sont actuellement classées en deux catégories correspondant à leur structure : les membranes organiques et les membranes minérales.

Parmi les membranes organiques utilisées, les polycondensats aromatiques présentent beaucoup d'intérêt ; elles résistent aux fortes températures et aux pH extrêmes.

Les membranes minérales connaissent un développement plus important et présentent l'avantage d'être résistantes aux agents chimiques. De plus, elles ont une grande stabilité thermique (400°C) et une bonne résistance aux grandes pressions (20 à 30 bars) [39].

Les plus connues sont les CARBOSEP formées d'oxyde de zirconium supporté sur du carbone graphite. Elles peuvent ultrafiltrer des solutions très visqueuses et sont insensibles aux oxydants, et aux attaques bactériennes ; d'où, leurs applications intensives dans les bioréacteurs à membranes pour les réactions enzymatiques [38].

Toute membrane est caractérisée par sa perméabilité et sa sélectivité. Cette dernière est quantifiée par son seuil de coupure et son taux de rejet.

- Le seuil de coupure de la membrane est la masse molaire correspondant à une rétention supérieure à 90%. Pour ce type d'opération, on utilise en général des solutions protéiques considérées comme solutions de références et cela dans des conditions bien définies ;
- Le taux de rejet apparent évalue la fraction de soluté retenue par la membrane.

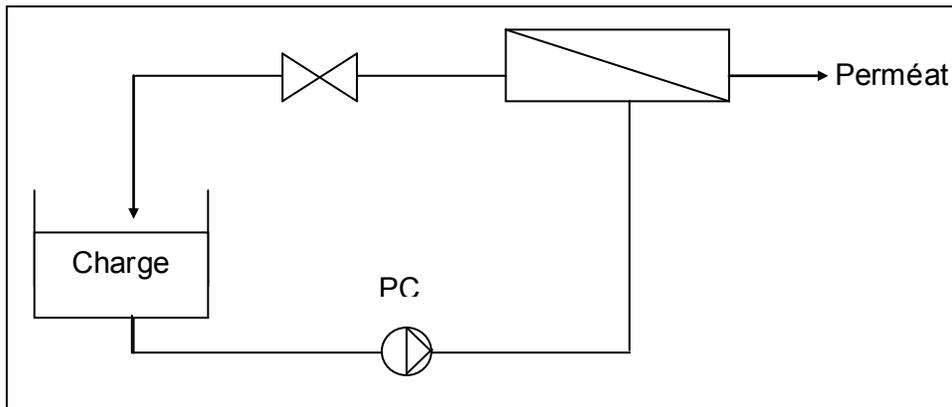
$$R = 1 - C_p / C_0 \quad (1)$$

Où C_p est la concentration du soluté dans le perméat
 C_0 est la concentration du soluté avant la traversée de la membrane

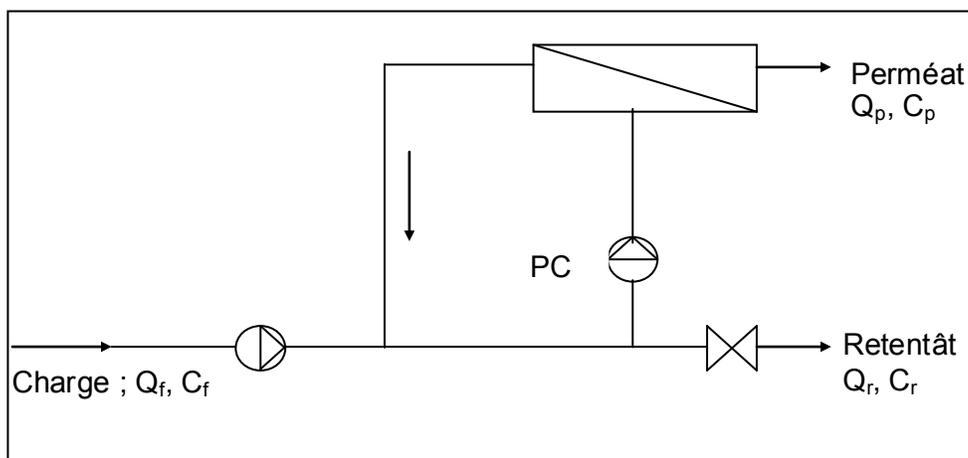
3.3 Les différents procédés d'ultrafiltration

L'ultrafiltration s'effectue de trois manières différentes :

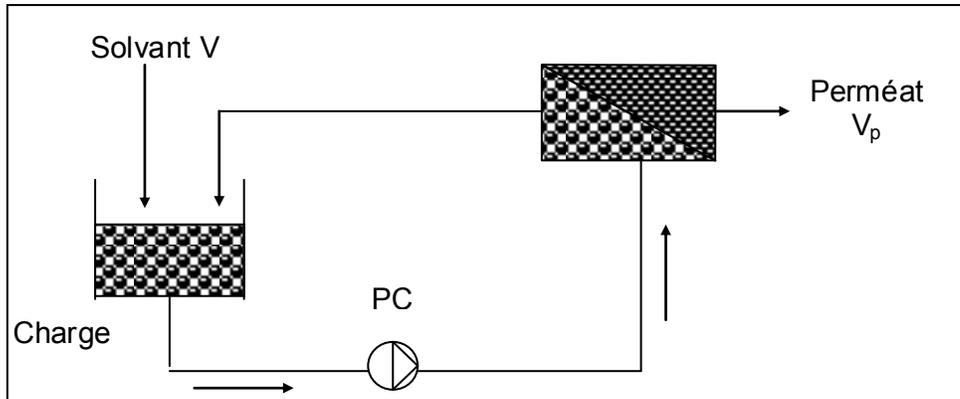
L'ultrafiltration en mode discontinu : le mode discontinu est souvent utilisé ; le perméat est recirculé vers un réservoir et le retentât est retenu par la membrane [39]



L'ultrafiltration en mode continu : le retentât n'est pas recyclé ; il est extrait de manière continue. Une deuxième pompe recircule une partie du retentât et de la solution à ultrafiltrer vers la membrane [39]
 Le perméat est recueilli de manière continue ; le débit d'alimentation doit être égal à la somme des débits de perméat et du retentât.



La diafiltration : le mode de diafiltration est similaire au mode discontinu mais le volume du perméat est remplacé à taux constant par un volume de solvant dans le retentât.



Les molécules et les cellules sont ainsi purifiées.

3.4 Les modèles d'ultrafiltration

Pour comprendre et modéliser le mécanisme de l'ultrafiltration, plusieurs chercheurs ont émis des modèles.

3.4.1 Modèle du tamis moléculaire

La membrane est assimilée à un ensemble de pores symétriques identiques. Le flux du solvant J_v est proportionnel à la pression ΔP et obéit à la loi de POISEUILLE.

$$J_v = \frac{N \cdot \Pi \cdot (rp)^4}{8 \cdot \mu \cdot e} \cdot \Delta P \quad (2)$$

Où J_v est le flux du perméat (l/h.m²)

rp est le rayon moyen des pores (m)

e est l'épaisseur de la membrane (couche active)

N est le nombre des pores par unité de surface

μ viscosité dynamique

ΔP est la pression transmembranaire moyenne $\Delta P = \frac{P_e + P_s}{2}$ (bar)

P_e est la pression d'entrée

P_s est la pression de sortie

ΔP est la perte de charge souvent négligeable $\Delta P_f = P_e - P_s$

Cette loi a été simplifiée par DARCY

$$J_V = L_p \cdot \Delta P \quad (3)$$

Où L_p est la perméabilité à l'eau. Ce dernier paramètre est une caractéristique de la membrane.

La Figure 1.2 représente les flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire pour un solvant pur (courbe 1) et pour une solution de macromolécules (courbe 2).

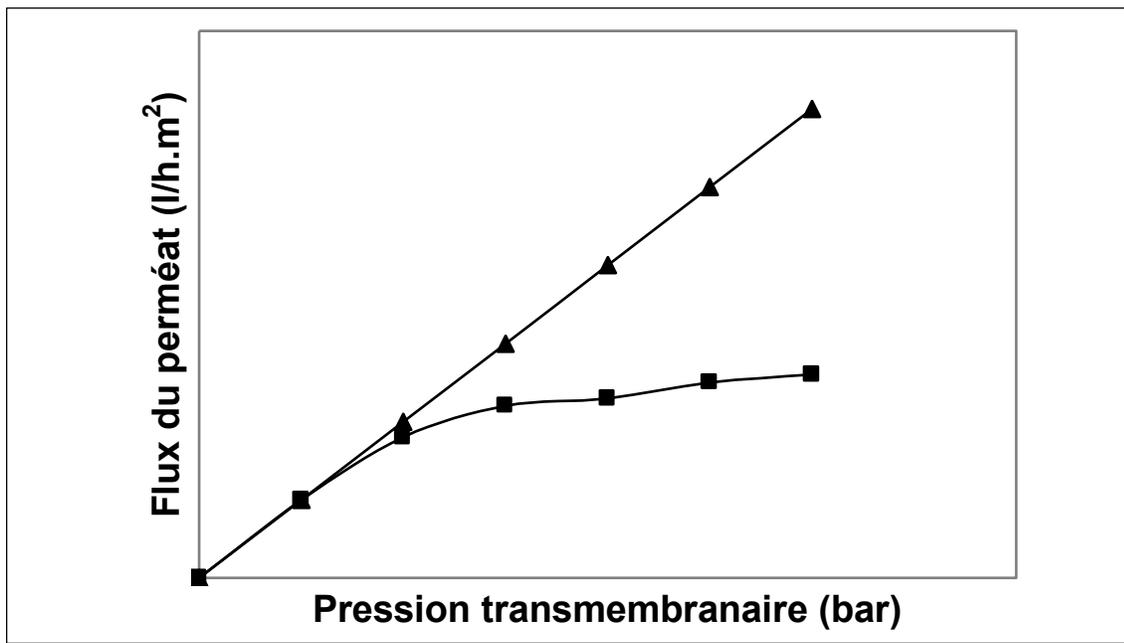


Figure 1.2 : Evolution du flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire
(▲) Courbe 1 ; (■) Courbe 2

La courbe 1 obéit à la loi de DARCY, ce qui n'est pas le cas pour la courbe 2, pour laquelle une couche de polarisation se forme au fur et à mesure entraînant une accumulation des molécules du soluté au voisinage de la membrane.

3.4.2 Modèle du film

Le fluide à traiter s'écoulant tangentiellement à la membrane, il se crée à l'interface une couche concentrée de matière avec écoulement laminaire du fluide ; c'est la couche de polarisation de concentration. Dans cette zone, les solutés retenus s'accumulent de manière réversible et deux types de transport se produisent en sens inverse et simultanément, dans le sens radial [40].

- Apport de solutés vers la membrane par convection due au flux transmembranaire ;
- Diffusion en retour des solutés vers le cœur de l'écoulement sous l'effet du gradient de concentration qui s'établit.

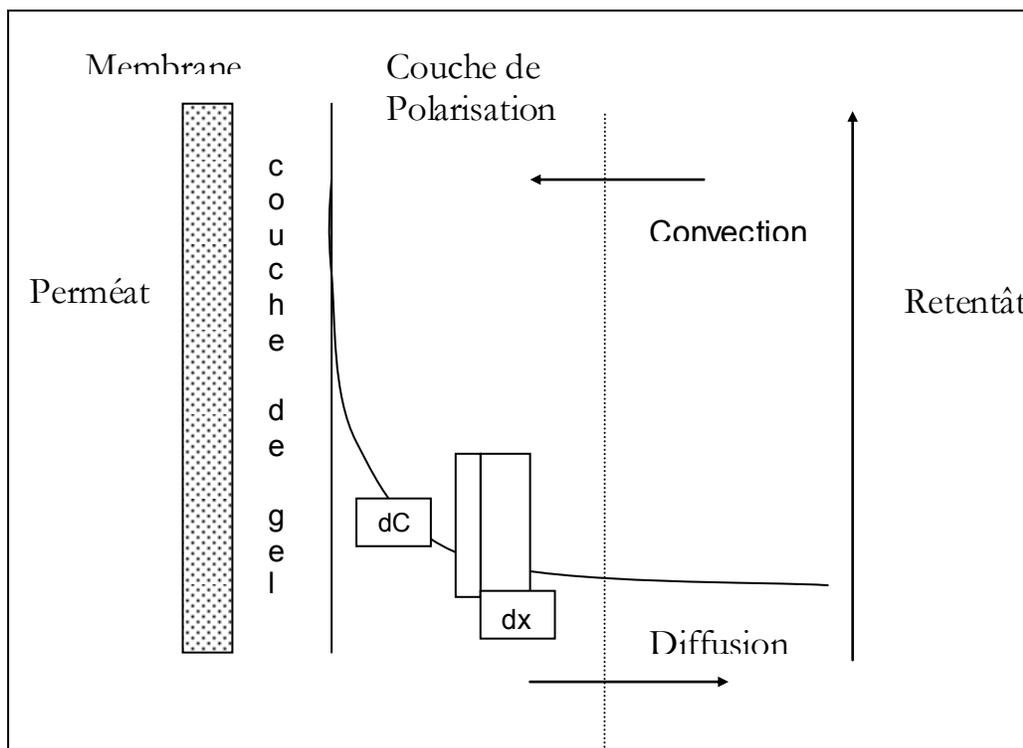


Figure 1.3 : Modèle du film.

Le bilan en flux s'écrit en régime stationnaire.

Le flux de transfert de matière = flux de diffusion exprimé par la loi de FICK

$$J_v.C - J_v.C_p = D.\frac{dC}{dx} \quad (4)$$

Avec

C : concentration du soluté dans la couche limite à l'abscisse x

C_p : concentration du soluté dans le perméat

D : coefficient de diffusion (m^2/s)

dC/dx : gradient de concentration du soluté ($kg/m^3/m$)

Après intégration :

$$J_v = \frac{D}{\delta} Ln \frac{C_m - C_p}{C_0 - C_p} = K.Ln \frac{C_m - C_p}{C_0 - C_p} \quad (5)$$

Où K : coefficient de transfert de matière à l'interface fluide membrane.

C_m : concentration de soluté à la surface en amont de la membrane.

δ : épaisseur de la couche de polarisation.

C_0 : concentration initiale du soluté dans la charge

Si la concentration C_m atteint une valeur C_g correspondant à la saturation, les macromolécules forment un gel, source d'une résistance supplémentaire au transfert de matière. A ce stade une élévation de pression est sans effet sur le flux de perméat ; elle ne fait qu'amplifier l'apport des solutés à l'interface avec pour conséquence un épaissement du dépôt de gel [41].

Le flux maximum que l'on peut atteindre est $J_{v,lim} = K.Ln \frac{C_g}{C}$

3.4.3 Modèle osmotique

Les hypothèses émises lors de l'établissement de ce modèle sont [41-42]

- Le gradient de concentration existant de part et d'autre de la membrane devient suffisamment important quand la pression augmente pour induire une différence de pression osmotique $\Delta\Pi$ non négligeable devant la pression appliquée ;
- Pour une solution donnée, la pression osmotique peut être reliée à la concentration par une loi polynomiale.

De ces hypothèses, on aura :

$$J = \Delta P / \mu R_m = (\Delta P - \Delta \Pi) / \mu R_m \quad (6)$$

Où μ est la viscosité dynamique (Pa / s).

J_v : flux du perméat

R_m : résistance hydraulique de la membrane propre (m^{-1})

$\Delta \Pi$: pression osmotique

En présence de solutés, différents phénomènes prennent naissance au niveau de la membrane, la densité du flux aura pour expression :

$$J_v = (\Delta P - \Delta \Pi) / [\mu_p (R_m + R_c)] \quad (7)$$

Avec R_c : Résistance due au colmatage de la membrane et éventuellement au gel (m^{-1})

3.5 Colmatage des membranes

Le facteur limitant de l'utilisation de l'ultrafiltration est la chute au cours du temps du flux du perméat due principalement à la polarisation de concentration puis au colmatage [38][43].

Les macromolécules retenues par la membrane tendent à s'accumuler pour former une couche limite au voisinage de l'interface ; le flux du perméat diminue au début, pour atteindre une valeur stable en régime stationnaire. Ce phénomène est dit : polarisation de concentration.

Au cours du colmatage, le flux du perméat n'est pas limité d'une manière constante en régime stationnaire ; Celui-ci décroît régulièrement [39].

Le colmatage a lieu en trois étapes :

- L'établissement de la polarisation de concentration
- L'adsorption des macromolécules
- La polymérisation de la couche adsorbée.

Le problème fondamental est la réduction de cette couche limite et la maîtrise de son évolution par :

- La réduction de la pression pour diminuer le flux transmembranaire

- L'utilisation de vitesses élevées ou de turbulences au niveau des pores membranaires et diminuer ainsi l'épaisseur de la couche limite.

4. Partie expérimentale

Notre étude a consisté à produire des acides aminés et des peptides à haute valeur nutritive, à partir d'un rejet solide de poissonnerie. Par ailleurs, l'utilisation d'une protéase commerciale, telle la pepsine, produite avec un haut degré de pureté risque d'être assez coûteuse et être un frein, en terme économique, à l'exploitation de ce procédé. En revanche, la préparation d'une enzyme brute "pepsine" à partir de l'estomac de mouton, suffisamment pure, permettrait à cette méthode biologique d'être plus attrayante pour les industriels. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps mis au point un protocole en vue de préparer une pepsine brute performante. Enfin nous nous sommes attelés à comparer ses performances aux enzymes commerciales lors de l'hydrolyse des rejets de poissonneries.

4.1. Préparation de l'enzyme brute

La pepsine brute utilisée est préparée selon le protocole expérimental développé par Pigott et Liu [31]. Juste après l'abattage du mouton, l'estomac est vidé de son contenu puis bien nettoyé à l'eau du robinet. La muqueuse est décollée intacte de la caillette, puis hachée dans un moulin à viande; l'ensemble est ensuite congelé à (-20°C) dans des sacs en plastique pour toutes les utilisations ultérieures.

Le poids sec de la muqueuse est déterminé avant son utilisation. Ce paramètre est utilisé comme référence pour évaluer les quantités de muqueuse utilisée lors de l'essai d'hydrolyse. Le poids sec est exprimé en (%) et se calcule par la relation suivante :

$$X (\%) = (M_2/M_1).100 \quad (8)$$

M_1 : le poids humide de la muqueuse

M_2 : le poids sec de la muqueuse après 24h de séchage à 105°C

L'auto digestion de la muqueuse stomacale est nécessaire pour activer le pepsinogène en pepsine brute. Elle s'effectue en milieu acide de la manière suivante:

- Quatre masses de 50mg de muqueuse en poids sec sont décongelées et introduites dans une série de quatre béchers (50mg/bécher) et ensuite acidifiées avec 100 ml de HCl (0,01N). Le pH est ajusté aux valeurs suivantes 1 ; 1,5 ; 1,75 et 2 durant les 30 premières minutes de l'agitation.

- Après 6 heures d'agitation les quatre échantillons sont filtrés à travers un tissu afin de retenir les boues formées. Elles sont ensuite mélangées à des solutions de HCl (0,01N) pour un volume final de 500ml. Ces solutions de pepsine sont ensuite stockées à (4°C) et des essais de test sur l'activité de cet enzyme sont réalisés.

Les tests d'activité sont effectués en ajoutant 4ml de la solution de pepsine brute à 1ml de solution test de protéine ramenée préalablement à la température d'essai. Cette dernière est soit une protéine standard (la Bovine Serum Albumine (B.S.A) de chez Sigma Chemical Co. St Louis, USA, sous forme de poudre blanche, d'une pureté allant de 98% à 99%, contenant 1,3% d'eau et 15,9% d'azote, de structure moléculaire sphérique, très soluble dans l'eau, de poids moléculaire: 64000 daltons ; soit un rejet de poissonnerie. Le mélange est incubé à la même température durant 10 minutes [32]. La réaction est stoppée après 10 minutes par ajout de 10ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 4%. Après un temps minimum de 5 minutes la solution est filtrée à travers un papier filtre (Wattman n°3). La détermination de la concentration des acides aminés et peptides libérés est effectuée au spectrophotomètre à la longueur d'onde 280 nm.

Les performances de cette enzyme ont été comparées à celle de la pepsine commerciale fournie par Sigma avec une activité enzymatique déclarée par le fournisseur de 980 unités par mg de protéines.

4.2 Etude du rejet

Les rejets de poissons proviennent de la conserverie de Dellys, située à 120 km à l'Est d'Alger. Le rejet solide de cette conserverie consiste en un mélange complexe de déchets (contenant les têtes, les viscères, les arêtes et espèces pélagiques etc.) issus d'une chaîne d'opération de nettoyage et de vidage des poissons.

4.2.1 Prélèvement

Le rejet est prélevé dans un flacon stérile dans des conditions aseptiques, et transporté dans une caisse glacière à une température inférieure à 4°C. L'analyse est effectuée dans un délai maximal de huit heures après le prélèvement.

La préparation de l'échantillon a nécessité l'ouverture aseptique du flacon de prélèvement et, une homogénéisation consistant en un broyage vigoureux du rejet dans un mixer jusqu'à obtention d'une pâte liquide. Enfin, nous avons procédé à une standardisation de la solution mère. Pour ce faire, trois solutions mères ont été

retenues après dilution du rejet dans de l'eau physiologique stérile ayant pour rapport volume de la pâte/volume d'eau physiologique : 1/1, 1/ 2 et 1/3.

A partir de chacune de ces solutions mères des dilutions de dix en dix ont été effectuées.

4.2.2 Analyses microbiologiques

Au niveau de la conserverie de Dellys, le vidage du poisson se fait à l'air libre, d'où l'exposition du rejet à une contamination microbienne. Nous avons donc effectué les tests suivants et cela sur une durée d'une année :

- Dénombrement des germes totaux
- Recherche des germes de contamination fécale : Coliformes totaux et fécaux, Streptocoques, Staphylocoques et Clostridium sulfito-réducteurs (C.S.R)
- Recherche des Salmonelles

Les résultats obtenus lors des analyses microbiologiques sont repris sur le tableau 1.2.

Tableau 1.2 : Résultats des tests microbiologiques du rejet solide de la poissonnerie de Dellys.

(nombre de germes par grammes de rejet solide)					
	C. totaux	E.coli	S. fécaux	Staphylocoques	C.S. R
Moyenne	1991,25	1144,00	2188,75	621,50	497,62
Ecart	1383,30	1187,84	1733,55	288,32	257,62
Normes	< 10/100 ml	0/100 ml	0/50 ml	-	< 5/100 ml

De prime abord, nous constatons que l'écart type est élevé. Ce résultat est probablement du à l'application peu rigoureuse du nettoyage, des outils de production et du site d'entreposage des rejets solides surtout en saisons chaudes où les germes prolifèrent plus rapidement.

4.2.3. Analyses chimiques

Les analyses chimiques quantifieront le rejet du point de vue de sa valeur nutritionnelle. Pour ce faire, il a été déterminé le taux d'humidité de l'échantillon, les cendres, les graisses et les protéines et cela tout au long d'une année. Ces techniques d'analyses sont présentées en annexe 1.

Les résultats expérimentaux de l'analyse chimique du rejet sont représentés sur le tableau 1.3.

Tableau 1.3: Composition moyenne annuelle du rejet solide de la poissonnerie de Dellys.

Constituants (% en poids)	Moyenne	Ecart type
Humidité	80,0	0,5
Cendres	4,8	0,5
Graisses	2,2	1,6
Protéines	13,7	0,6

Le mélange contient 20% de matière sèche avec une moyenne de 13,7% de protéine, avec une concentration variable de lipides.

L'écart type élevé obtenu pour les graisses est justifié par le fait que naturellement les poissons sont peu gras durant l'hiver. Le taux de protéines est relativement élevé en comparaison à celui donné par la bibliographie [16]; cela indique la présence de proportions comestibles dans le rejet qui serait une conséquence directe de la main d'œuvre peu qualifiée.

4.3 Hydrolyse des rejets solides de poissonneries

Les essais d'hydrolyse enzymatique du rejet solide de poissonnerie sont réalisés sur un échantillon broyé avant utilisation. L'échantillon solide du rejet de poissonnerie (100g) est ajouté à un égal volume d'eau (100ml). Après homogénéisation, le pH du mélange est ajusté à un pH donné avec du HCl concentré et ramené à la température de 48°C dans un bain-marie. La solution de pepsine préalablement chauffée à la même température est versée doucement dans le mélange eau rejet soumis à une agitation modérée ($v = 300-400$ t.p.m) durant la période d'hydrolyse (4 heures). Des aliquotes de 20ml sont soutirés du mélange réactionnel à des intervalles de temps respectés, ensuite mélangés à 10ml d'acide trichloroacétique pour stopper la réaction. Après 10 à 15 minutes l'ensemble est filtré à travers le papier Wattman n°3.

Les acides aminés et les peptides libérés dans le filtrat sont quantifiés par la méthode du Biuret (annexe 1).

Les résultats sont exprimés en rendement d'hydrolyse défini comme le rapport de la quantité de peptides et acides aminés hydrolysés aux protéines initiales contenus dans le substrat de poisson.

5. Résultats et discussion

5.1 Activité de la pepsine préparée

La préparation de l'enzyme brute à partir de la muqueuse d'estomac de mouton a été effectuée à température ambiante pour trois pH: 2, 1 et 0,5. Nous constatons d'après les résultats présentés sur la Figure 1.4 qu'une période de 12 heures d'incubation est suffisante pour obtenir la meilleure activité et cela quelle que soit la valeur du pH. De même, ces résultats indiquent que le pH = 1 correspond au pH optimum d'auto digestion.

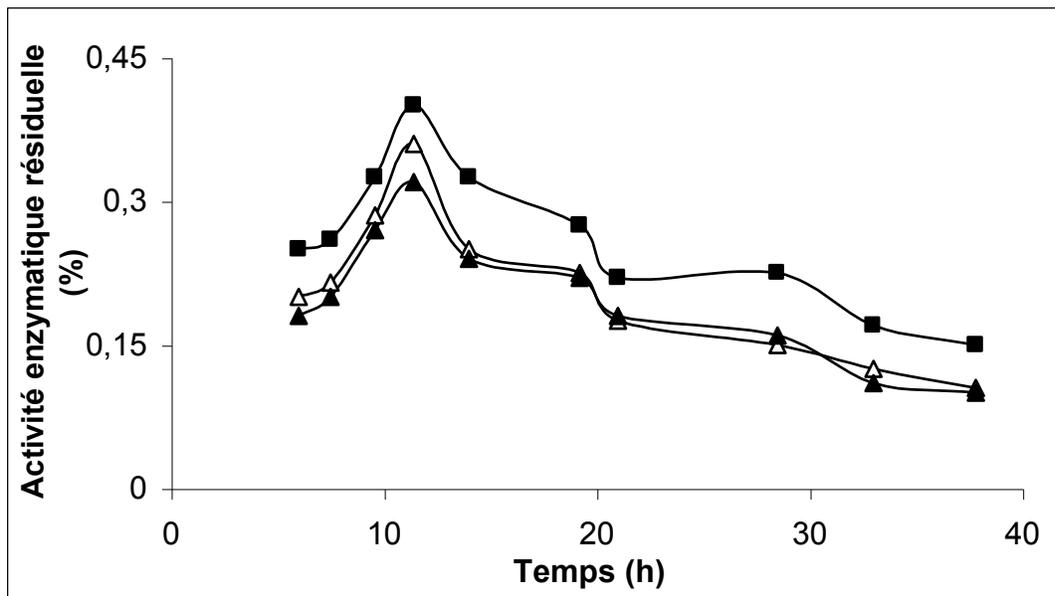


Figure 1.4: Evolution de l'activité de la muqueuse en fonction de la durée d'incubation. Substrat BSA (25g/l), T=20°C. (Δ) pH= 0.5, (■) pH=1 et (▲) pH=2.

Il est important de déterminer la stabilité de cette enzyme durant sa conservation à basse température. L'activité protéolytique de ces préparations est évaluée à 20°C à l'aide d'une solution de BSA comme protéine standard.

Les résultats présentés sur la Figure 1.5 indiquent que plus le pH est bas, meilleure est l'activité de l'enzyme brute.

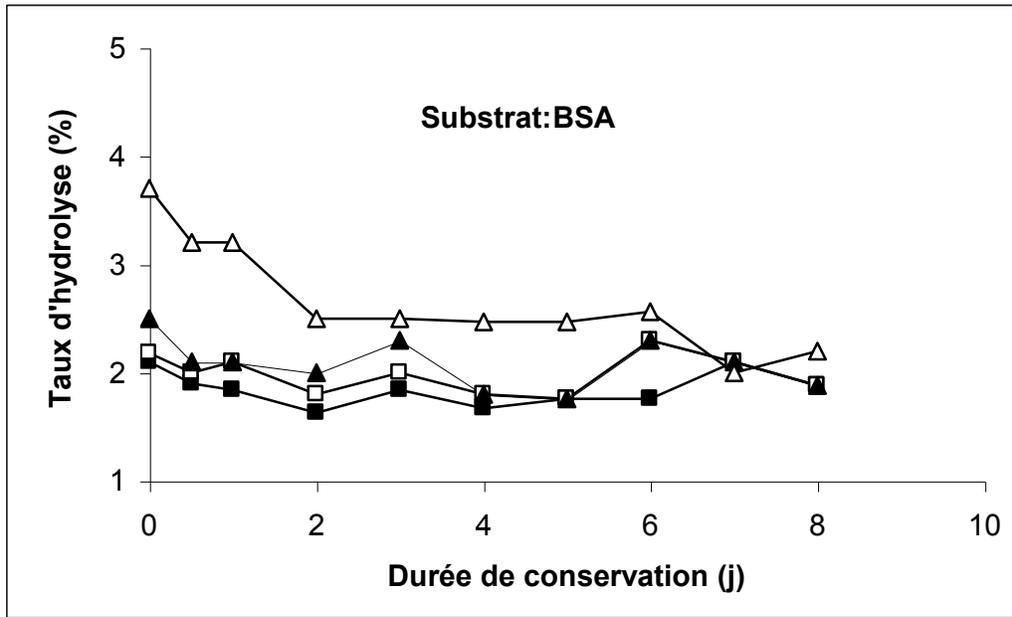


Figure 1.5: Evolution de l'activité de la muqueuse d'estomac de mouton à différents pH pendant la durée de conservation. Substrat (25g/l) et $T = 20^{\circ}\text{C}$. (■) pH = 2,0; (□) pH = 1,75; (▲) pH = 1,5; (Δ) pH = 1.

Pour des valeurs de pH supérieur à 1, la conservation de la préparation enzymatique ne modifie pas pratiquement son activité pendant les huit jours. Par contre, pour le pH 1, il apparaît une nette chute de l'activité de l'ordre de 30% dès les premiers jours, suivie d'une tendance de l'activité enzymatique à se stabiliser.

De tels résultats suggèrent que l'auto digestion des préparations enzymatiques se poursuive à basses températures (à l'intérieur du réfrigérateur), plus particulièrement à bas pH. Il sera donc plus intéressant d'un point de vue économique de préparer la pepsine brute à pH = 1 et de l'utiliser le plus tôt possible.

Des résultats préalablement obtenus nous pouvons déduire qu'il serait intéressant que l'auto digestion soit pratiquée à pH = 1, à température ambiante durant 12 heures et que la préparation enzymatique soit utilisée aussitôt que possible.

5.2 Optimisation de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de la préparation brute dans les conditions optimales préalablement citées a été comparée à celle de la pepsine commerciale.

5.2.1. Influence de la température et du pH sur l'activité enzymatique

Les valeurs optimales de la température et du pH sont déterminées en utilisant pour les solutions d'enzymes deux types de substrat: la BSA et les rejets de poissonnerie.

L'étude de l'influence de la température sur les performances de l'enzyme indique (Figures 1.6 et 1.7) que la valeur optimale de la température de notre préparation se situe entre 35°C et 45°C lors de l'essai d'activité avec la BSA comme substrat.

En opérant avec les protéines de poisson comme substrat, l'activité maximale est obtenue à une température de l'ordre de 48°C. Ce dernier résultat est probablement dû à une meilleure résistance des protéines naturelles aux fortes températures [33].

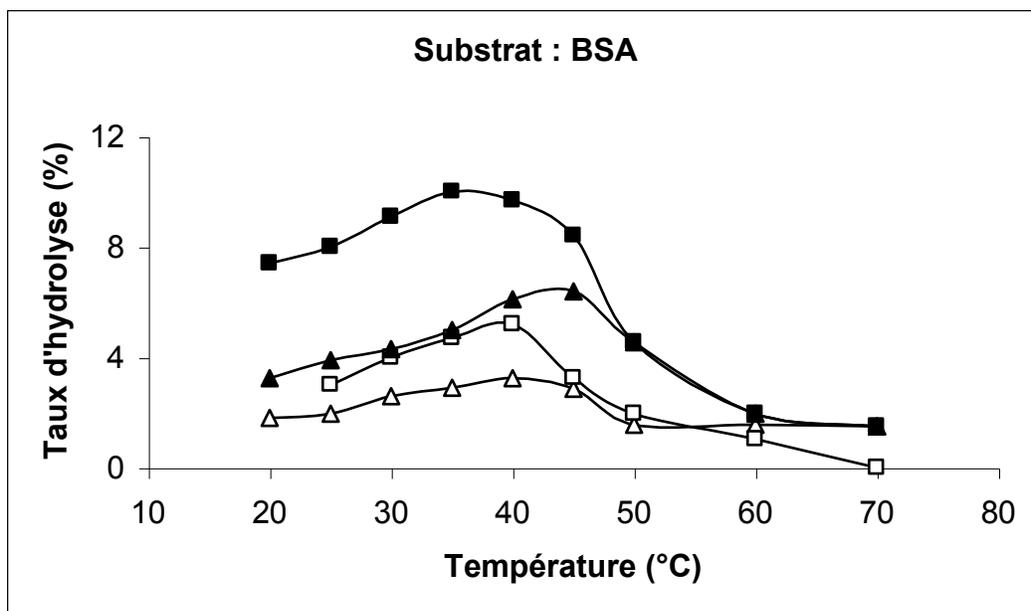


Figure 1.6 : Évolution de l'activité enzymatique sur la BSA en fonction de la température. Substrat (25g/l). (△) Pepsine brute (0,1g/l) ; (□) Pepsine commerciale (0,1g/l); (▲) Pepsine brute (0,5g/l); (■) Pepsine commerciale (0,5g/l).

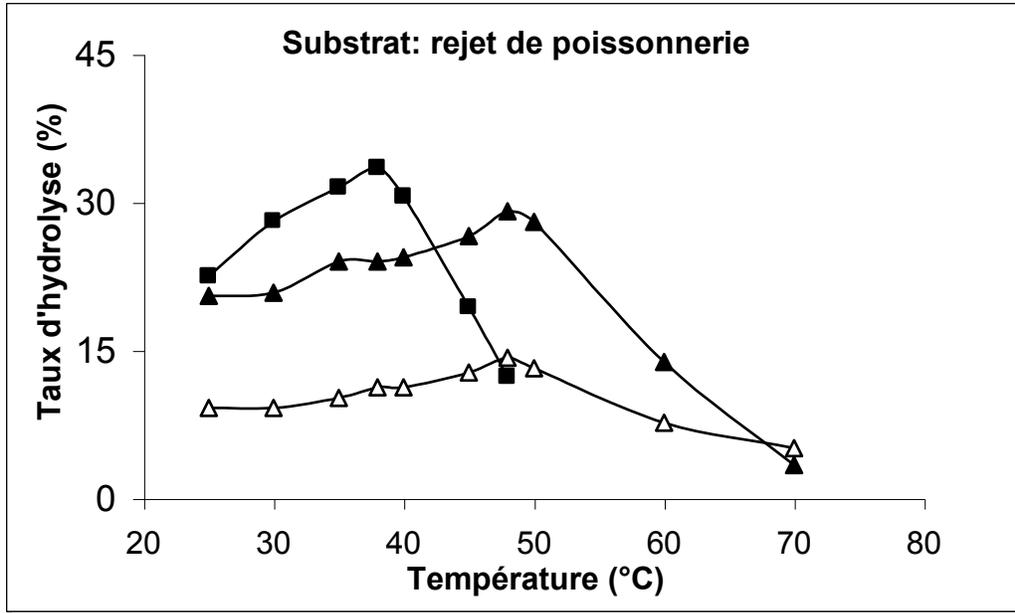


Figure 1.7 : Evolution de l'activité enzymatique sur le rejet de poissonnerie en fonction de la température, Substrat (17,5g/l); (Δ) Pepsine brute (0,3g/l); (\blacktriangle) Pepsine brute (0,5g/l); (\blacksquare) Pepsine commerciale (0,5g/l).

Les deux solutions de pepsine sont testées à leur température optimale dans une zone de pH de 1,0 à 3,0.

Les résultats obtenus sont présentés sur les Figures 1.8 et 1.9.

La plus grande activité pour la solution de pepsine brute est obtenue à pH =1,5 et cela pour les deux substrats (BSA et rejet de poissonnerie).

Par contre, pour la pepsine commerciale, la valeur du pH=2,0 donne une activité maximale confirmant les conditions optimales fournies par le fabricant Sigma

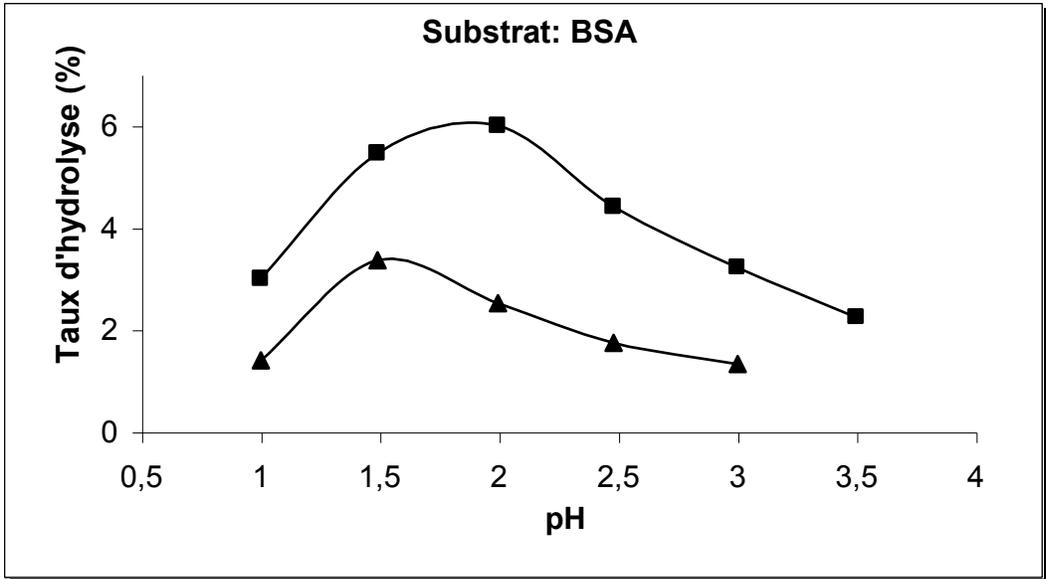


Figure 1.8: Evolution de l'activité enzymatique sur le substrat BSA en fonction du pH. Substrat (25g/l) et T=20°C ; (▲) Pepsine brute (0,1g/l) ; (■) Pepsine commerciale (0,5g/l)

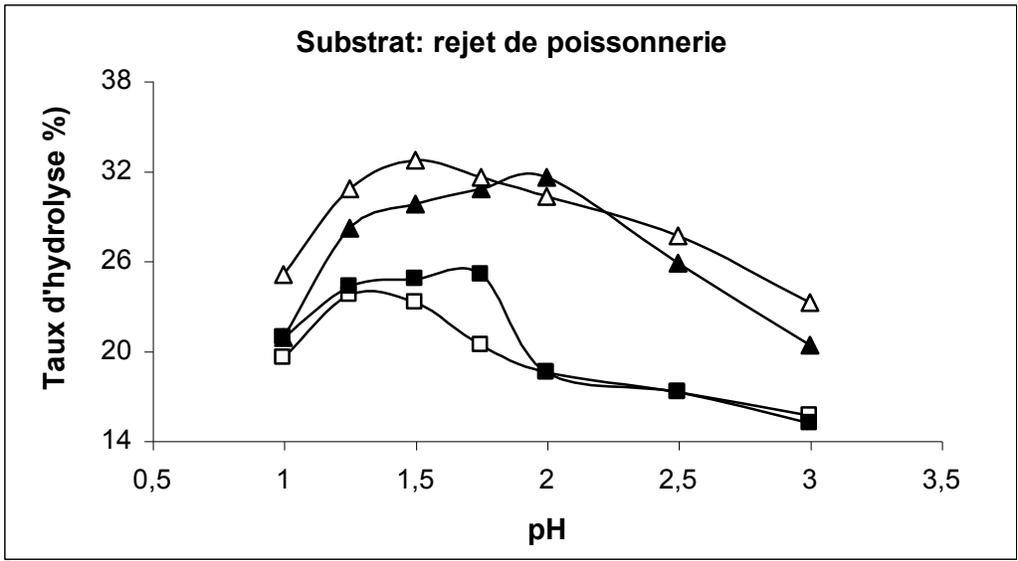


Figure 1.9: Evolution de l'activité enzymatique sur le rejet de poissonnerie en fonction du pH. Substrat (7g/l) et T=20°C ; (□) Pepsine brute (0,3g/l) ; (■) Pepsine commerciale (0,3g/l) ; (▲) Pepsine commerciale (0,5g/l) ; (Δ) Pepsine brute (0,5g/l)

Enfin, il ressort de cette première étape que la pepsine brute préparée par auto digestion de la muqueuse stomacale de mouton en milieu acide (pH=1 et temps d'incubation de la pepsine brute préparée=12 heures) pourrait être utilisée lors du processus d'hydrolyse enzymatique des rejets de poissonnerie.

Les conditions optimales d'hydrolyse déterminées sont: pH=1,5–2,0, température=48°C.

5.2.2 Etude de l'hydrolyse enzymatique pepsine rejet de poissonnerie

L'étude expérimentale de l'hydrolyse enzymatique des rejets solides de la poissonnerie consiste à suivre en fonction du temps, l'évolution du mélange réactionnel complexe enzyme substrat aux conditions optimales ci-dessus présentées.

L'effet du rapport enzyme/substrat pour un rapport enzyme préparée en poids sec/rejet en poids humide de 1/100, 2/100 ; 3/100 ; et 6/100 est illustré sur la Figure 1.10. Nous remarquons qu'un rapport 1/100 conduit à une réaction d'hydrolyse complète durant les deux premières heures de la réaction. Celle ci peut être due à la forte utilisation de l'enzyme par le substrat du fait de sa faible teneur.

D'autre part, un rapport enzyme préparée en poids sec /rejet humide de 6/100 impose à la réaction une faible vitesse initiale et après 4 heures d'hydrolyse le rendement est du même ordre de grandeur que celui obtenu avec le rapport 1/100.

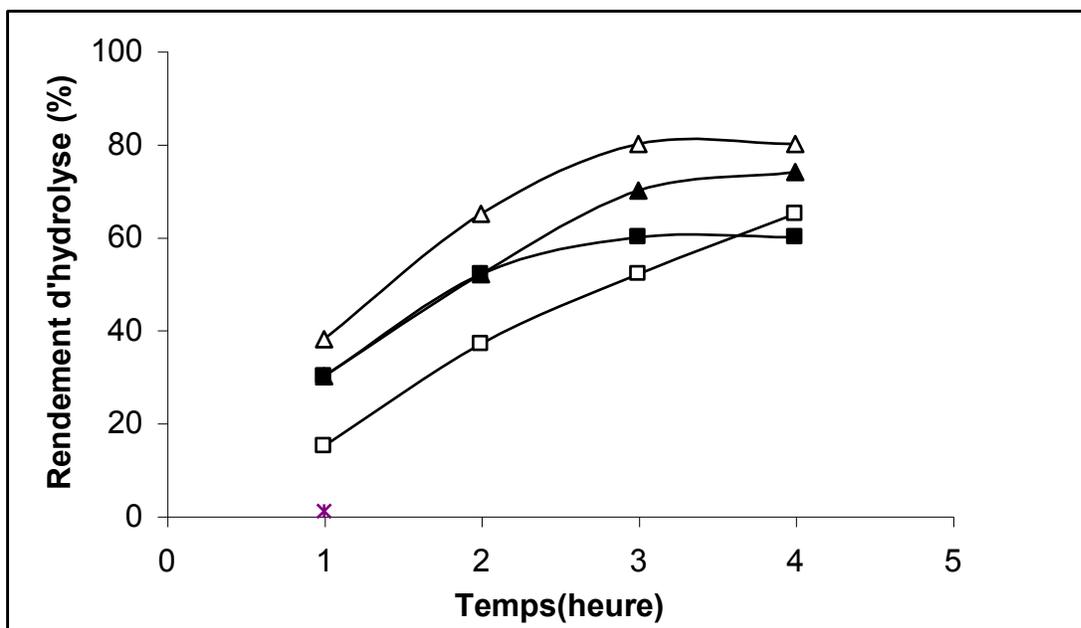


Figure 1.10 : Evolution du rendement d'hydrolyse à différents rapports Enzyme-Substrat (g/g). pH 1,5 et T= 48°C.(□) E/S=6/100 ; (■) E/S=1/100; (▲) E/S=3/100; (Δ) E/S=2/100.

Un rapport, muqueuse en poids sec/rejet en poids humide de 2/100 correspond à un rendement maximum de 85% après 4 heures d'hydrolyse.

L'effet du rapport eau substrat sur le taux d'hydrolyse est présenté sur la Figure 1.11.

Les résultats obtenus montrent que le rapport 1/1 correspond au meilleur taux d'hydrolyse.

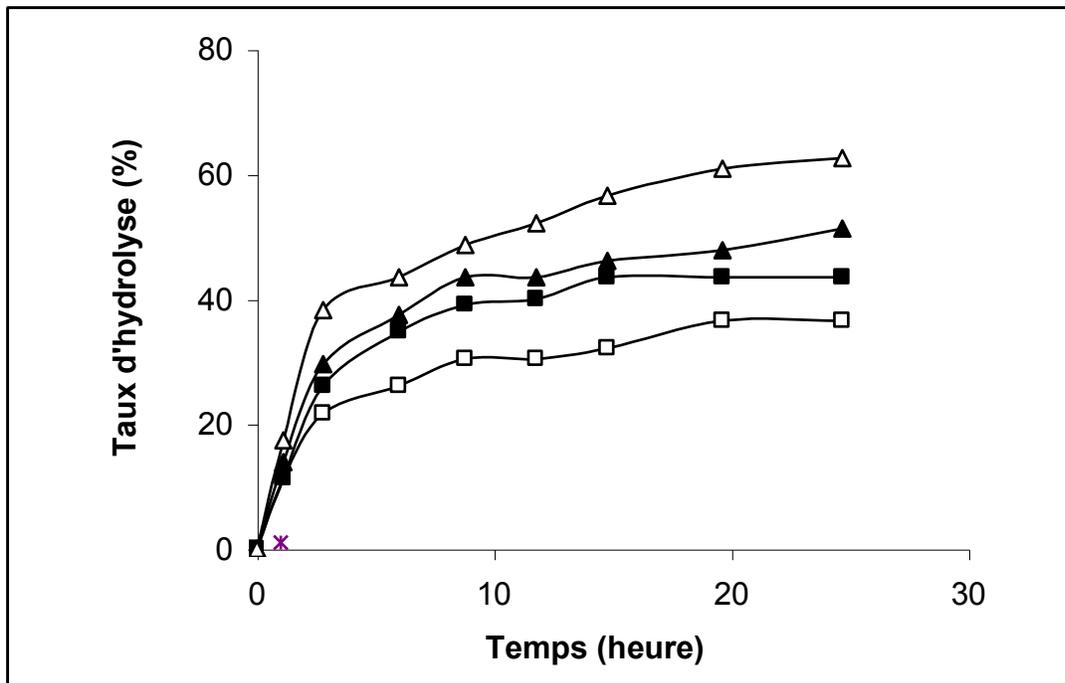


Figure 1.11 : Variation du taux d'hydrolyse en fonction du rapport eau/substrat. pH=1,5, T=48°C, Enzyme préparée sèche/rejet =2/100 ; (□) Eau/rejet=8/1 ; (■) Eau/rejet=4/1 ; (▲) Eau/rejet=2/1 ; (Δ) Eau/rejet=1/1.

La cinétique d'hydrolyse a été réalisée par quantification de peptides et d'acides aminés dans le mélange réactionnel en fonction du temps dès les premières minutes de la réaction.

De l'évolution de la concentration de protéines de poisson hydrolysées par la pepsine brute en fonction du temps nous avons pu déduire les paramètres cinétiques (Figure 1.12 et 1.13).

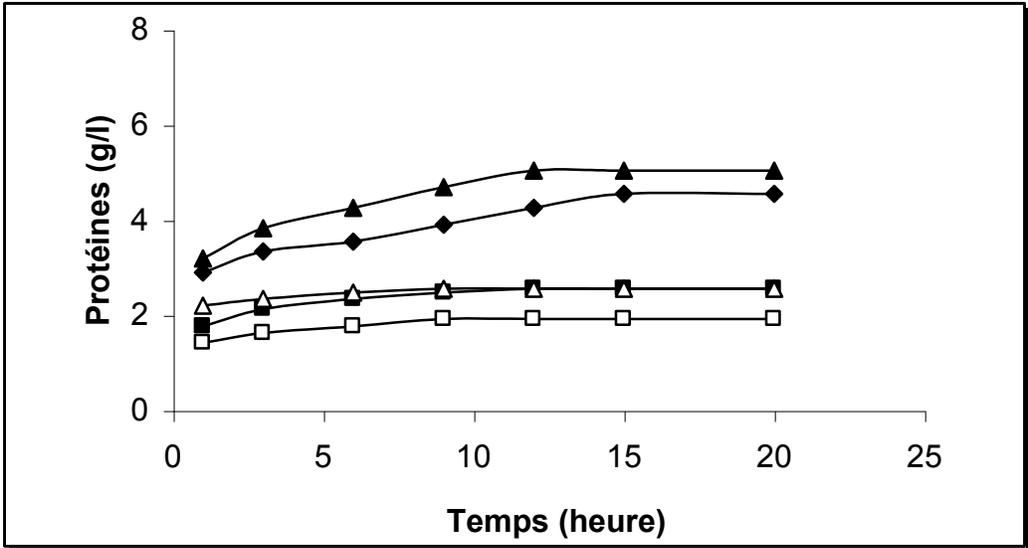


Figure 1.12: Cinétique d'hydrolyse des protéines de poisson par la pepsine brute pH=1,5 et T= 48°C. (□) P₀=3,5g prot./l; (■) P₀=5,6g prot./l; (△) P₀=10g prot./l; (◆) P₀=18,7g prot./l; (▲) P₀=14g prot./l.

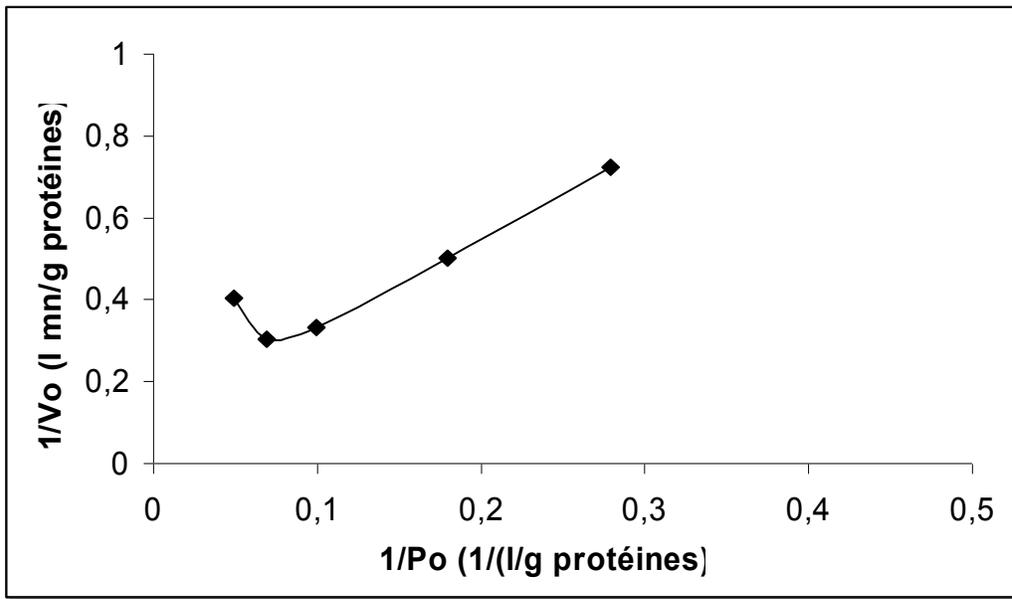


Figure 1.13 : Représentation de 1/V en fonction de 1/Po

La détermination des paramètres cinétiques révèle une cinétique Michaélienne et apparition d'une inhibition par le substrat. En effet, la quantité de protéines dans le réacteur en début d'hydrolyse ne doit pas dépasser une concentration de 14g/l. La représentation en double inverse de Lineweaver-Burk (Figure 1.13) conduit aux constantes cinétiques : $K_m = 16,7\text{g de protéines/l}$ et $V_m = 8,3\text{g de protéines/lmin}$

5.3 Essai en semi- pilote et couplage à l'ultrafiltration

Des essais à l'échelle semi-pilote ont été réalisés dans les conditions optimales préalablement déterminées à l'échelle laboratoire. Nous présentons ci dessous le réacteur utilisé lors de ces essais.

5.3.1. Description de l'installation et mode opératoire

Le réacteur biologique assurant le processus d'hydrolyse enzymatique du rejet solide de la poissonnerie de Dellys est schématisé sur la Figure 1.14.

Il comprend :

- (1).Réacteur : il est de forme cylindrique, de fond plat et de capacité 60 litres.
- (2).Thermomètre à contact
- (3).Mélangeur
- (4).Chauffage régulateur : une résistance électrique en acier-inox assure le chauffage du milieu réactionnel à la température de consigne
- (5).Chauffage d'entretien : une résistance électrique en acier-inox assure le chauffage du milieu réactionnel à la température de 100°C.

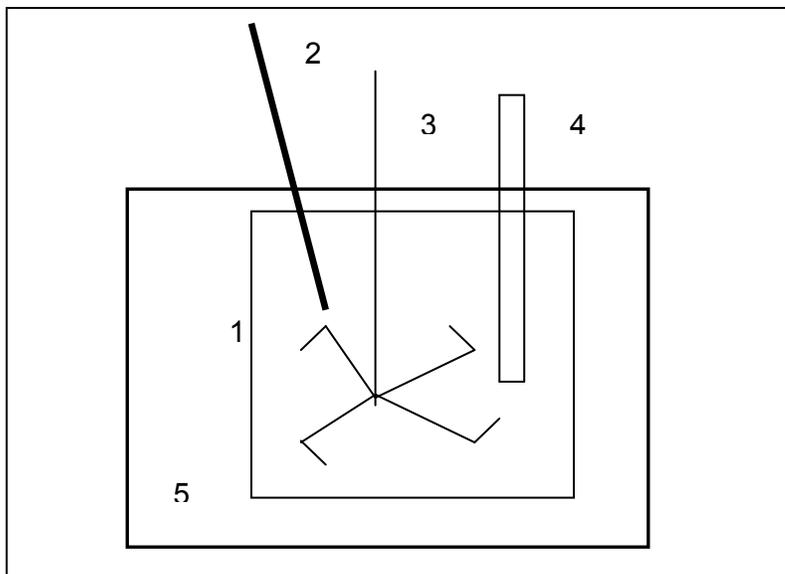


Figure 1.14 : Schéma du réacteur biologique.

Dans le réacteur enzymatique, 5 kg de rejet finement broyé sont dilués avec un égal volume d'eau et, le mélange est homogénéisé pendant 2 minutes. L'homogénéisation permet le mélange intime de tous les constituants et, par voie de conséquence augmente la vitesse de la réaction. Il est par ailleurs, important de noter, qu'une homogénéisation longue augmenterait l'émulsion des lipides et des protéines freinant ainsi l'activité enzymatique et donc, diminuerait le rendement.

Le pH du milieu à hydrolyser est ajusté avec du HCl concentré jusqu'à un pH = 1,5 et la température maintenue à 48°C. La solution de pepsine de pH=1,5 est ramenée à la même température juste avant d'être ajoutée dans le réacteur en quantité optimale; c'est à dire 2% en poids sec de muqueuse/poids humide de rejet.

Le taux d'hydrolyse est suivi au cours du temps en quantifiant les peptides et acides aminés libérés dans le réacteur

A la fin de la réaction, la mise en marche du chauffage d'entretien permet d'atteindre une température de 100°C au bout de quelques minutes dans le but de désactiver l'enzyme et de plus, stériliser l'hydrolysât.

Après refroidissement, l'hydrolysât est soutiré du réacteur et passé au travers d'un tamis grossier (250µm) pour retenir les grosses fractions tels que les arêtes, la peau, les écailles...

L'hydrolysât, débarrassé des grosses fractions, contient toujours une quantité importante de lipides qui seront séparées des protéines par simple centrifugation.

L'évolution du rendement d'hydrolyse dans le réacteur semi continu est présentée sur la Figure 1.15:

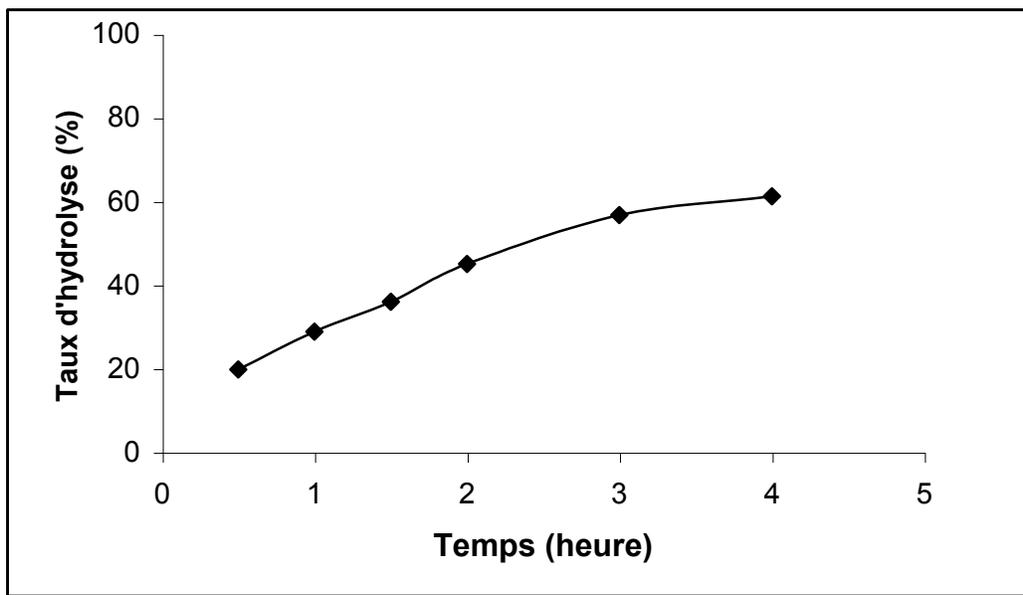


Figure 1.15 : Essai d'hydrolyse à l'échelle semi-pilote. Pepsine: pH = 1,5, T = 48°C, eau/rejet = 1/1 et muqueuse en poids sec/rejet en poids humide = 2/100.

On remarque, pour la pepsine préparée relativement à l'échelle laboratoire, une chute du rendement de 80% à 63% et cela dans les mêmes conditions opératoires. Cette chute serait due aux difficultés de maîtrise des paramètres influençant le processus à l'échelle pilote. Mais toutefois les pertes de rendement, lors du scale-up, sont couramment rencontrées en industrie et non spécifique à la nature de l'enzyme mais, plutôt imputable à la maîtrise des paramètres hydrodynamiques du mélange réactionnel qui devient plus délicat avec une forte croissance du volume de ce dernier.

Nous avons pu confirmer cela en reprenant des expériences à l'échelle laboratoire et en opérant sans agitation pour certaines expériences en vue de les comparer avec celles effectuées sous agitation.

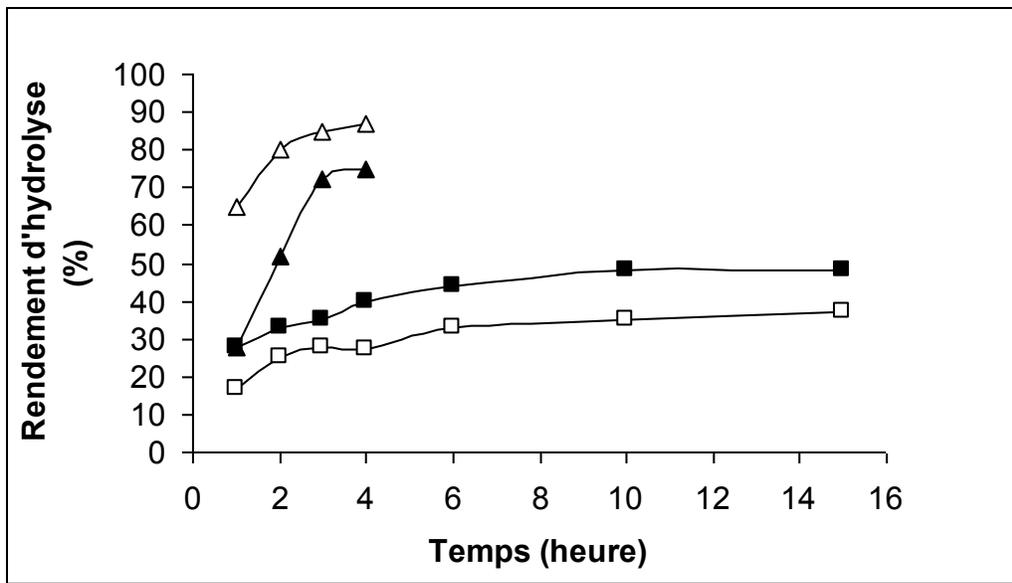


Figure 1.16 : Evolution du rendement d'hydrolyse avec et sans agitation. Essai à pH 1,5 ; T = 48°C ; muqueuse sèche/rejet humide : 3/100) ; (□) Pepsine brute sans mélange ; (■) Pepsine commerciale sans mélange ; (▲) Pepsine brute avec mélange ; (△) Pepsine commerciale avec mélange.

Les résultats obtenus lors d'une hydrolyse enzymatique conduite sans agitation du milieu réactionnel conduit à un taux d'hydrolyse de 40% (Figure 1.16).

Ces résultats, comparés à ceux de l'hydrolyse sous agitation et sous des conditions expérimentales similaires, nous amènent à conclure que l'agitation est un paramètre opératoire important pour l'efficacité de ce procédé.

Des essais pilotes ont ensuite été effectués avec le réacteur de capacité de 60 litres couplé à une unité pilote d'ultrafiltration de type 130 S, fabriquée par la société Gamma filtration (France) et équipée d'un module de membranes minérales de type Membralox-Ceraver.

Ce module (P19-40) est en céramique, de géométrie multi canal. La membrane est composée d'une couche poreuse ultrafine en ZrO_2 ($0,05\mu m$) qui elle même est supportée par un support poreux à base d'alumine ($15\mu m$). La surface totale de filtration de ce module est de $0,2\text{ m}^2$.

Le dispositif du réacteur enzymatique à membrane est présenté sur la Figure 1.17

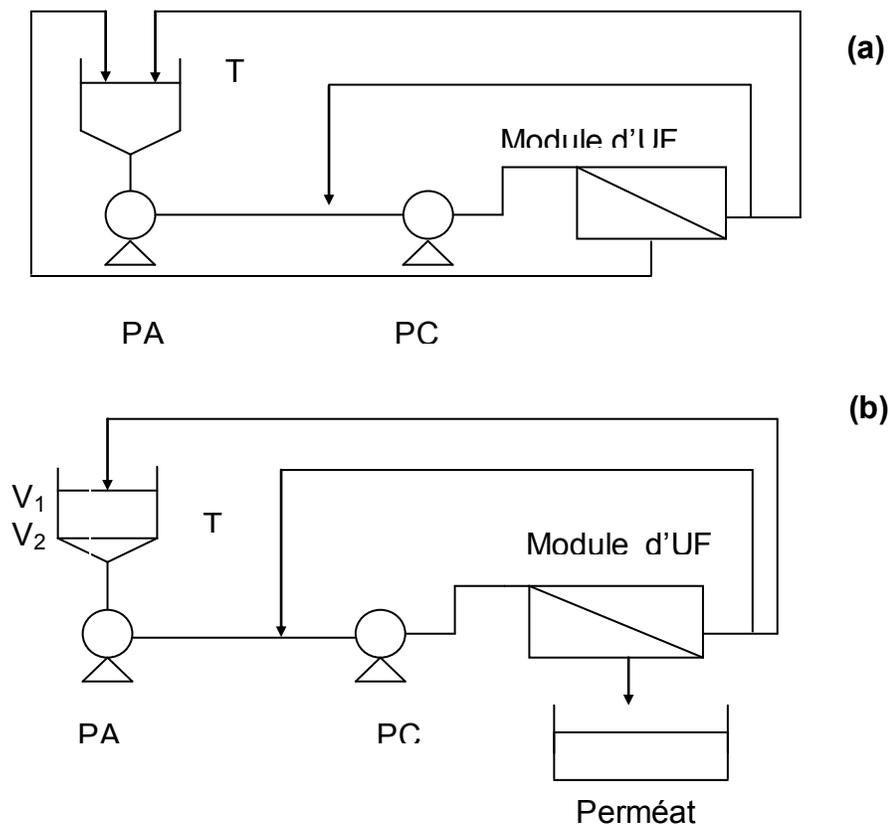


Figure 1.17 : Représentation schématique du processus d'Ultrafiltration.

(a) avec recirculation ; (b) sans recirculation

T : Réacteur d'hydrolyse enzymatique ; PA : Pompe d'alimentation

M : Module d'Ultrafiltration ; PC : Pompe de recyclage

L'ultrafiltration a opéré suivant deux modes de fonctionnement. Le premier mode (Figure 1.17a) a consisté à réinjecter la totalité du perméat dans le volume réactionnel jusqu'à l'obtention d'un taux d'hydrolyse jugé intéressant.

Une fois ce taux obtenu, on commence l'opération de concentration qui consiste à opérer sans recyclage du perméat (Figure 1.17b), c'est à dire en augmentant la concentration du volume réactionnel.

Le comportement de la membrane d'ultrafiltration en termes de rétention a été suivi durant l'expérience en fonction des paramètres hydrodynamiques, à savoir la vitesse de recirculation (U) et la pression transmembranaire (ΔP). En ce qui concerne la vitesse de recirculation, nous avons utilisé la vitesse optimale $U=6$ m/s, déterminée lors de l'optimisation du traitement des eaux de lavage de poissonnerie par le biais de cette unité pilote équipée du même type de membrane [34].

La rétention de la membrane est caractérisée par le taux de rejet observé R_o qui correspond à la fraction de soluté retenu par la membrane et se détermine par le biais de l'équation suivante :

$$R_o = (1 - C_p / C_d) \cdot 100 \quad (9)$$

Une fois l'hydrolyse enzymatique effectuée (après 4 heures), le réacteur enzymatique à membrane a été maintenu en mode recirculation (Figure 1.17a).

Dans ce cas, nous avons effectué le suivi des produits hydrolysés aussi bien dans le volume réactionnel que dans le perméat et cela en fonction de la pression transmembranaire (ΔP).

Les résultats, donnant le flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire, sont présentés sur la Figure 1.18

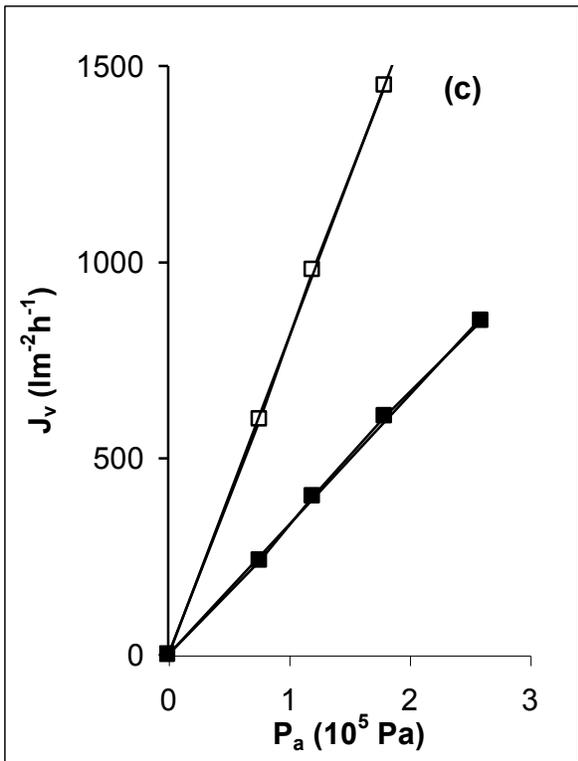
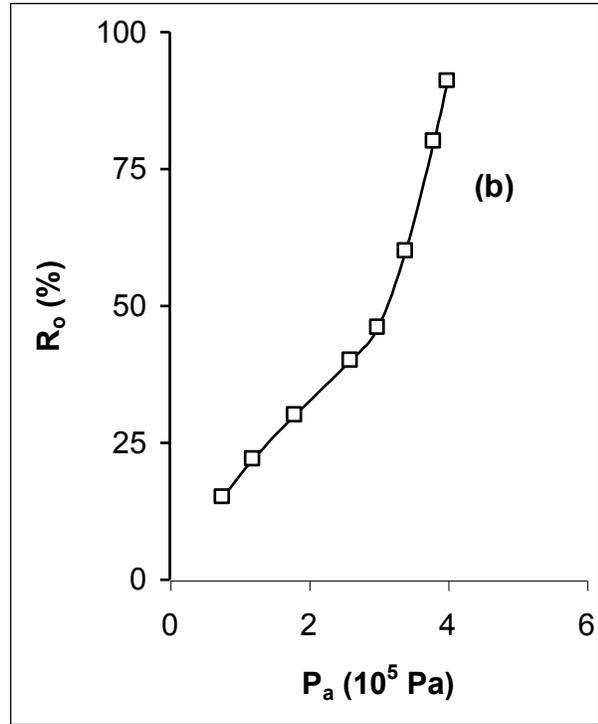
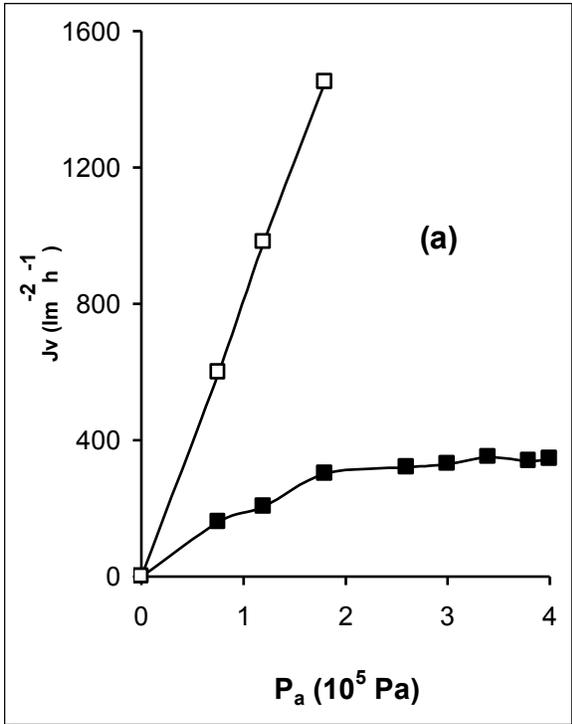


Figure 1.18 : Ultrafiltration de l'hydrolysât à concentration constante, $U=6\text{m/s}$, $T=48^\circ\text{C}$

- (a) (□) Courbe solvant avant ultrafiltration (■) Ultrafiltration de l'hydrolysât
- (b) Coefficient de rejet en fonction de la pression transmembranaire (P_a)
- (c) (□) Courbe solvant avant ultrafiltration, (■) Courbe solvant après ultrafiltration

Les résultats obtenus, présentés sur la Figure 1.18a, indiquent une forte chute du débit de perméat par rapport à la courbe du solvant. De même, au-delà d'une pression de 02 bars, le flux de perméat est indépendant de la pression transmembranaire. Ce résultat peut s'expliquer par la formation d'une couche dynamique compressible au niveau de la membrane qui au fur et à mesure qu'on augmente la pression cela se traduit par une augmentation de la résistance au transfert du solvant à travers la membrane.

Un flux maximal de perméat de l'ordre de 300 l/m²h a été obtenu. Comme dans un bioréacteur à membrane, le flux de perméat n'est pas le seul paramètre indiquant les performances, il est important de suivre l'évolution du taux de rejet observé de la membrane en fonction de la pression transmembranaire.

Dans notre cas il a été constaté que le taux de rejet dépendait fortement de la pression transmembranaire. En effet, R_o passe d'une valeur de 20% pour $\Delta P = 1$ bar à $R_o = 90\%$ pour $\Delta P = 4$ bars (Figure 1.18b).

Ces résultats nous indiquent que la formation de la couche dynamique, déjà mis en évidence par Watanabe et al. [35], est compressible et joue le rôle de membrane avec une porosité dépendante de la pression transmembranaire.

Pour mieux étayer nos affirmations il a été décidé de déterminer le rayon de pores moyen r_{p1} après ultrafiltration de l'hydrolysât et cela par le biais de la relation de Poiseuille. En considérant que la variation du flux de perméat de la membrane est due à une diminution du rayon initial r_{p0} avant l'ultrafiltration de l'hydrolysât au rayon r_{p1} , et cela suite à l'adsorption des différents solutés sur la surface des pores.

L'équation de Poiseuille s'écrit donc :

$$J_V = N\pi r_{p1}^4 / 8\eta e \cdot \Delta P = L_{p1} \Delta P \quad (10)$$

$$L_{p1} = N\pi r_{p1}^4 / 8\eta e \quad (11)$$

$$L_{p0} = N\pi r_{p0}^4 / 8\eta e \quad (12)$$

Où

N est le nombre de pores par unité de surface, e représente l'épaisseur de la membrane et η est la viscosité du solvant.

Le rayon de pores moyen r_{p1} peut être ainsi déduit du rapport des deux perméabilités à l'eau de la membrane L_{p0} et L_{p1} obtenues respectivement avant et après ultrafiltration.

$$r_{p1} = r_{p0} (L_{p1} / L_{p0})^{0,25} \quad (13)$$

Les perméabilités à l'eau de la membrane L_{p0} et L_{p1} sont déterminées par l'obtention des pentes des droites des courbes solvant obtenues pour la membrane avant et après ultrafiltration de l'hydrolysât (Figure 1.18c).

La valeur du rayon de pores moyen $r_{p1} = 5 (0.4)^{0.25} 10^{-8} \text{ m} = 4.10^{-8} \text{ m}$ déterminée en se basant sur la relation de Poiseuille confirme qu'avec cette dimension les pores ne peuvent pas arrêter les petites macromolécules telles les peptides et acides aminés.

Donc nous pouvons affirmer que la rétention s'est effectuée grâce à la formation d'une couche de gel à l'interface membrane fluide créant le phénomène de la membrane dynamique qui permet d'atteindre ces taux de rejet.

Des taux de rejet du même ordre de grandeur allant de 60 à 90% ont été obtenus lors de la concentration des protéines à partir de rejet de poissonnerie par d'autres équipes de recherche [34,36].

De ces résultats, il apparaît que l'opération de concentration doit être effectuée à une pression transmembranaire de 4 bars, afin d'avoir un taux de rejet maximum. Les résultats obtenus, présentés sur la Figure 1.19 montrent que le régime permanent est atteint dès les dix premières minutes et, que le flux limite est de l'ordre de $250 \text{ l. m}^{-2}.\text{h}^{-1}$

Dès que la couche dynamique se forme au niveau de la membrane, c'est à dire après l'obtention du régime permanent, le taux de rejet se stabilise à des valeurs de l'ordre de 83%.

Un facteur de concentration volumique de l'ordre de 2,5 a été atteint en fin d'essai.

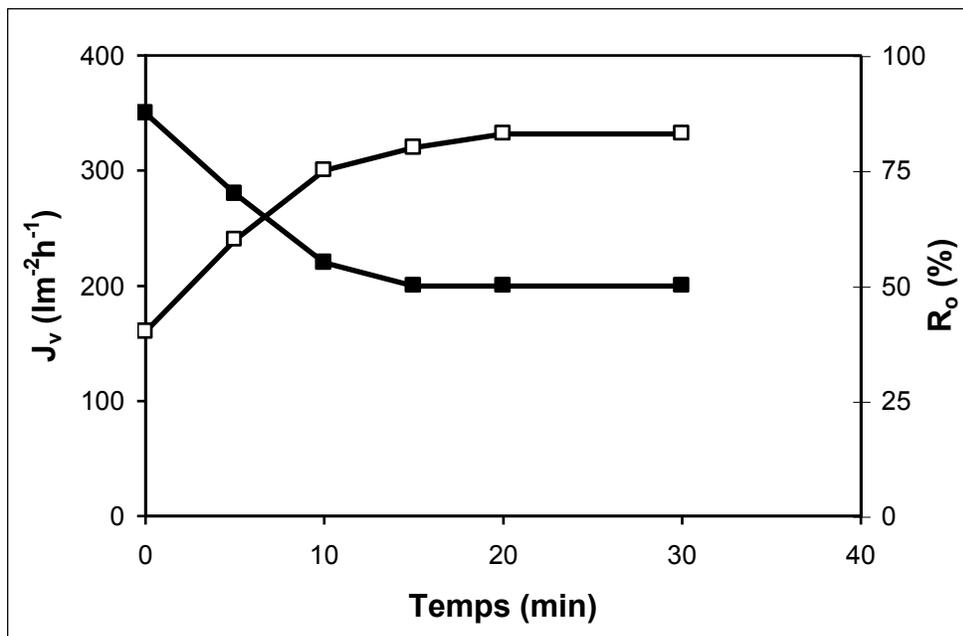


Figure 1.19 : Evolution du flux du perméat et du taux de rejet aux conditions expérimentales ; $P_a = 4.10^5$ Pa, $U=6$ m/s et $T=48^\circ$ C. (■) J_v et (□) R

Enfin, l'hydrolysât a été analysé par HPLC en vue de déterminer les différents acides aminés présents et de nous renseigner ainsi sur sa valeur nutritionnelle.

Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau 1.4.

Tableau 1.4 : Concentrations d'acides aminés dans l'hydrolysât

Tous les résultats sont en g / kg sauf pour le tryptophane en ppm.

Echantillon	1	2	Ecart type
Acide aspartique	0,11	0,09	0,014
Thréonine	0,05	0,06	0,007
Sérine	0,05	0,07	0,014
Proline	0,40	0,19	0,148
Glycine	0,37	0,06	0,219
Alanine	0,6	0,06	0,381
Cystine	1,44	0,18	0,890
Cystéine	0	0	
Valine	0,91	0,21	0,494
Méthionine	0,12	0,15	0,021
Isoleucine	0,64	0,05	0,417
Leucine	1,34	0,54	0,565
Tyrosine	0,17	0,08	0,063
Phénylalanine	0,66	0,32	0,240
Lysine	0,52	0,13	0,275
Histidine	0,05	1,25	0,848
Arginine	0,13	0,31	0,127
Tryptophane	68	25	30,40
Tryptophane avec hydrolyse chimique	78	74	2,828

Nous constatons que les huit acides aminés indispensables dans la ration alimentaire afin d'assurer une croissance normale sont bien présents, à savoir : Leucine, Isoleucine, Valine, Lysine, Méthionine, Tyrosine, Phénylalanine et Tryptophane.

6. Conclusion

La valorisation du rejet solide de la poissonnerie peut être réalisée par le processus d'hydrolyse enzymatique en utilisant une pepsine brute produite à partir de l'estomac du mouton par auto digestion durant 12 heures de la muqueuse stomacale en milieu acide (pH1,0) et dans les conditions optimales d'hydrolyse :

T= 48°C ; pH 1,5–2,0 ; muqueuse en poids sec /rejet humide=2/100 ; taux de dilution : eau/substrat=1/1 ; régime du mélange : v=300-400t.p.m.

Lors des essais d'hydrolyse, un rapport muqueuse en poids sec/rejet en poids humide de 2/100 a donné des taux d'hydrolyse importants à l'échelle du bêcher alors que l'hydrolyse à l'échelle semi-pilote dans un réacteur de capacité 60 litres, équipé d'un thermomètre, d'un agitateur électrique en continu et de deux résistances de chauffe assurant respectivement le chauffage régulateur et le chauffage d'entretien a donné un taux d'hydrolyse plus faible (63%). Cette différence serait du à la mauvaise maîtrise des paramètres hydrodynamiques influençant le phénomène d'hydrolyse à l'échelle semi-pilote.

Le couplage du réacteur à un pilote d'ultrafiltration en vue de réaliser l'opération de concentration s'est avéré intéressante avec des taux de rejets de l'ordre de 90%, rendant ainsi l'opération de séchage moins énergétivore ; c'est à dire le coût de production des FPH plus intéressant. De même, la qualité nutritionnelle des FPH produites est satisfaisante.

Il est donc suggéré de réaliser un séchage de l'hydrolysât par pulvérisation et par la suite l'incorporer aux rations alimentaires animales afin de mettre en évidence la valeur nutritive réelle de notre produit final.

Références bibliographiques:

- [1] Krisinsson HG, BA Rasco, Kinetics of the hydrolysis of Atlanta salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 2000, 36 131-139.
- [2] Kristinsson HG, Rasco BA, Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. Critical review in food science and nutrition, 2000, 40 (1) 43 –81.
- [3] Raju A A, Rose C, Rao N., Enzymatic hydrolysis of tannery fleshings using chicken intestine proteases. *Animal feed science and Technology*, 1997, 66 (1-4) 139-147.
- [4] Diniz F-M, Martin A-M .Optimisation of nitrogen recoverz in the enyzmatic hydrolysis dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. *International journal of food sciences and nutrition*, 1997, 48 (3) 191-200.
- [5] Audinos R, Branger J.L. Ultrafiltration concentration of enzyme hydrolysates. *Journal of Membrane Science*. 1992, 68, 3,195.
- [6] Guerard F, Dufosse L., De la Broise D, Binet A., Riva S., Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. *Journal of molecular catalysis B enzymatic*. 2001, 11(4-6) 1051-1059.
- [7] Liaset B., Lied E, Espe M., Enzymatic hydrolysis by products from the fish filleting industry, chemical characterisation and nutritional evaluation. *J Sci. Food Agric*. 2000, 80, 581-9.
- [8] A.M. Martin, D. Porter, in: G. Charalambous (Ed.), *Food Flavours: Generation Analysis and Process Influence*, Elsevier, Amsterdam, 1995, 1395.
- [9] O. Nettli, *Protein Recovery from Food Factory Waste using Ligno- sulfonates*, Alwatech. Harbitzalleen, N°3, Oslo Norway; 1982.
- [10] J. Spinelli, B. Koury, R. Miller, *J. Food Sci.*, 1972, 37, 599-605.
- [11] C. Audigié, G. Dupont, *Principes et méthodes d'analyses biochimiques*, Ed. Doin, Paris 1985.
- [12] J. Sheen shuh, T. S. Vidal, Effect of chemical and enzymatic degradation on the fonctionnal properties of fraction-1-protein, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, 36, (3) 445-449.
- [13] W. Tarky, *Protéin Hydrolysates From Fish Waste*. *Journal of Food Processing*, 1973, 38, 917-918.
- [14] M. B. Hale, *Using Enzymes to make Fish Protein Concentrate* *Marine Fisheries Review*, 1974, 35, 15-18.

- [15] C.J. Mowbray, Processing and Quality Assessment of Soluble Prepared From Dog-Fish Processing Waste, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, 36, 1329-1333.
- [16] G. O. Bucove, G. M. Pigott, Pilot Plant Production of a Functionnal Protein From Fish Waste by Enzymatic Digestion, *Proceeding of the 7 th Annual Symposium on Food Process Waste*, Washington, 1976, 66-81.
- [17] W. M. Meinke, K. F. Mattil, Fish Viscera Silage, *J. Food Science*, 1973, 38, 364-370.
- [18] Einer Clauser, Jan Raa, Preparation and Testing of an Autolysate of Fish Viscera as growth Substrate for Bacreria, *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50, (6) 1556-1557.
- [19] A.Gildberg, J. Raa, Properties of a propionic acid/Formic acid Preserved Silage of Cod Viscera, *J. Sci. Food Agric.* 1977, 28, 647-653.
- [20] J. Raa, A. Gildberg, Autolysis and Proteolytic Activity of Cod Viscera, *J. Food. Technol.* 1976, 11, 619-628.
- [21] K. A. Almas, Application of Crossflow Membrane Technology in the Fishing Industry, *Desalination*, 1985, 53,167-180.
- [22] F.M. Diniz, A.M.Martin, *Agric-Food-Ind. Hi-Tech.* 1997 May-June
- [23] S Benkajul, M.T. Morrissey, *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3423.
- [24] F.M. Diniz, A.M. Martin, *Food Sci. Technol. Int.* 1998, 4, 91.
- [25] N. G. Ferreira, H. O. Hultin, *J. Food. Process Preserv.* 1994, 18, 87.
- [26] M.R. Raghumath, *Fish Technol.* 1993, 30, 40.
- [27] G.B. Quaglia, E. Orban, *J. Sci. Food Agric.* 1987, 38, 263.
- [28] J. C. Collin, *Actualités des industries alimentaires et agroalimentaires*, I. A. A. 1988, 448-460.
- [29] P. Louisot, *Biochimie générale et médicale*, vol. 4, Ed. Simep, Lyon 1983.
- [30] C. Alais, *Abrégé de biochimie alimentaire*, Ed. Masson, Paris 1987.
- [31] G. M. Pigott, Ling Lin Liu, Preparation and Use of Inexpensive Crude Pepsin for Enzymatic Hydrolysis of Fish Protein, *Journal of Food Science*, 1981, 46, 1569-1573.
- [32] M. B. Hale, Relative Activities of Commercially Available Enzymes in the Hydrolysis of Fish Protein, *Food Technology*, 1969, 23, 107-110.
- [33] J.Shuh Sheen, L. Volney Sheen: Characteristic of Fraction-1-Protein Degradation by Chemical and Enzymatic Treatment, *Journal of Food Chemistry*, Nov-Dec 1987, 35, (6) 948-952.

- [34] N. Mameri, D. Abdesmed, D. Belhocine, H. Lounici, C. Gavach, J. Sandeaux and R. Sandeaux. Treatment of fishery washing waters by ultrafiltration. *Journal of Chemical and Biotechnology*, 1996, 67, 169-175.
- [35] Watanabe A., Ohtani T., Horirita H., Ohya H. and Kimura S. Recovery of soluble proteins from fish filly processing with self rejection dynamic membrane. *Food Eng. and Proc. Appl.*, 1986, 2, 225-36.
- [36] Y. Miyata, Concentration of protein from the wash water of red meat fish by ultrafiltration membrane. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 1984, 50, 659-63.
- [37] M. Goldberg, D. Chevrier. Traitement du plasma de bovin par ultrafiltration. Estimation des surfaces nécessaires, *Industrie Alimentaires et Agricoles*, 1979.
- [38] H.G.R. Rao, A.S. Grandison, M.J. Lewis (1994). Flux pattern and fouling of membranes during ultrafiltration of some dairy products, *J. Sci Food Agric.* 1994, 66, 563-571.
- [39] J.P. Brun, *Procédés de séparation par membranes*, Ed. Masson, 1989.
- [40] O. Gaouar. Etude d'un réacteur continu à membrane d'ultrafiltration pour la conversion enzymatique de l'amidon de manioc en sirop de maltose. Thèse doctorat, université de Montpellier 1, France, 1995.
- [41] J. Wijmans , S. Nakao. Hydrodynamic resistance of concentration polarisation boundary layers in ultrafiltration. *Journal of membrane science*, 1986, 20, 249-252.
- [42] J. Wijmans, S Nakao . Flux limitation in ultrafiltration, osmotic pressure and gel layer model. *Journal of membrane science*, 1984, 20, 115-119.
- [43] H.C. Van Der Horst. Fouling of organic membranes during processing of dairy liquids, Fouling and cleaning in pressure driven membrane process, *Int. dairy. Fed*, 1995, 36-52.

PARTIE 2 VOLET 1

PRODUCTION DES SUCRES FERMENTESCIBLES À PARTIR DU GRIGNON D'OLIVE

1. Introduction

L'olivier est si ancien que personne ne sait qui est à l'origine de la conservation de ses fruits ou de l'idée de les presser pour en faire de l'huile. Il constitue une composante familière des pays du bassin méditerranéen et représente pour beaucoup d'entre eux une des principales cultures traditionnelles. Les rejets de moulin d'huilerie sont des sous produits, dans la fabrication de l'huile d'olive qui polluent l'environnement et leurs 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.

Plusieurs travaux sur le traitement et la valorisation de ces rejets ont été effectués ces dernières décennies. Les eaux issues de ces rejets, de part leur faible concentration en composés organiques azotés, et leur richesse en sources carbonées, offrent un environnement très favorable pour la croissance des micro-organismes fixateurs d'azote [1]. Ces eaux ont également été utilisées comme substrat dans la production de polysaccharides extracellulaires à haut rendement [2]. La production de micro-algues *Clorrella pyrenoidosa* et *Scenedesmas obliquas* est réalisée à partir de ces eaux de rejets [3].

Des recherches considérables ont également été conduites durant ces dernières décennies sur les nouvelles possibilités offertes par les enzymes pour le traitement et la valorisation des composés lignocellulosiques. La littérature concernant ces travaux s'orientant vers le développement de systèmes enzymatiques pour les déchets solides a été largement revue récemment [4]. La saccharification enzymatique, de différents composés lignocellulosiques a été utilisée pour la production de sucre, et autres produits [5-8].

Avant le développement de la saccharification enzymatique, les différents composés lignocellulosiques brutes sont prétraités pour les rendre plus accessible à la saccharification, dont le résultat serait l'augmentation de la production de sucres [9-13].

Le but de ce travail serait donc l'optimisation de la saccharification des rejets de moulin d'huilerie après prétraitement à l'hydroxyde de soude, et hydrolyse en présence d'une cellulase commerciale : l'enzyme de *Trichoderma reesei*.

2. Généralités sur l'olive et ses sous produits

2.1 Origine et production

L'origine de l'olivier se perd dans la nuit des temps; son histoire se confond avec celle des civilisations qui ont vu le jour autour du bassin méditerranéen. Au cours de périodes plus récentes, l'olivier a poursuivi son expansion au-delà de la méditerranée, s'implantant dans des régions fort éloignées de son lieu d'origine comme l'Afrique du sud, l'Australie, le Japon et la Chine.

La production d'huile d'olive a toujours été concentrée dans les pays du pourtour méditerranéen; Espagne, Portugal, Italie, Grèce, Turquie, Tunisie et Maroc.

A eux seuls ces pays représentent plus de 90% de la production mondiale. 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 millions d'oliviers occupant environ 165000 hectares, représentant près de 37% de la surface arboricole nationale. Sa production est estimée à 300 millions de tonnes d'olives. (FAO, 2002)

L'évolution de la production mondiale est représentée sur le graphique ci-dessous pour les dix dernières années.

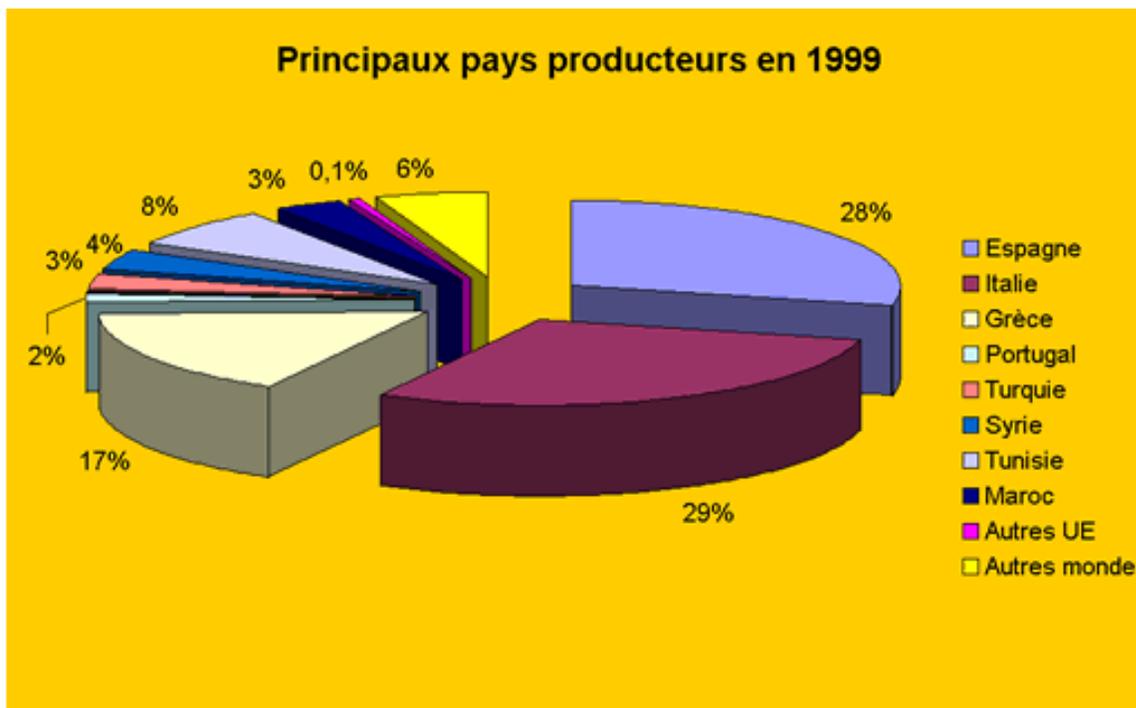


Figure 2.1 : Production mondiale d'huile d'olive selon Secrétariat CNUCED, d'après les données de la FAO.

Les principaux pays consommateurs sont également les principaux pays producteurs. Les pays du pourtour méditerranéen représentent 77 % de la consommation mondiale d'après les données de la FAO.

2.2 Technologie de production d'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 micro-organismes par le biais de blessures du fruit [14].

Le système de production d'huile comprend en général cinq opérations qui sont représentées sur la Figure 2.2:

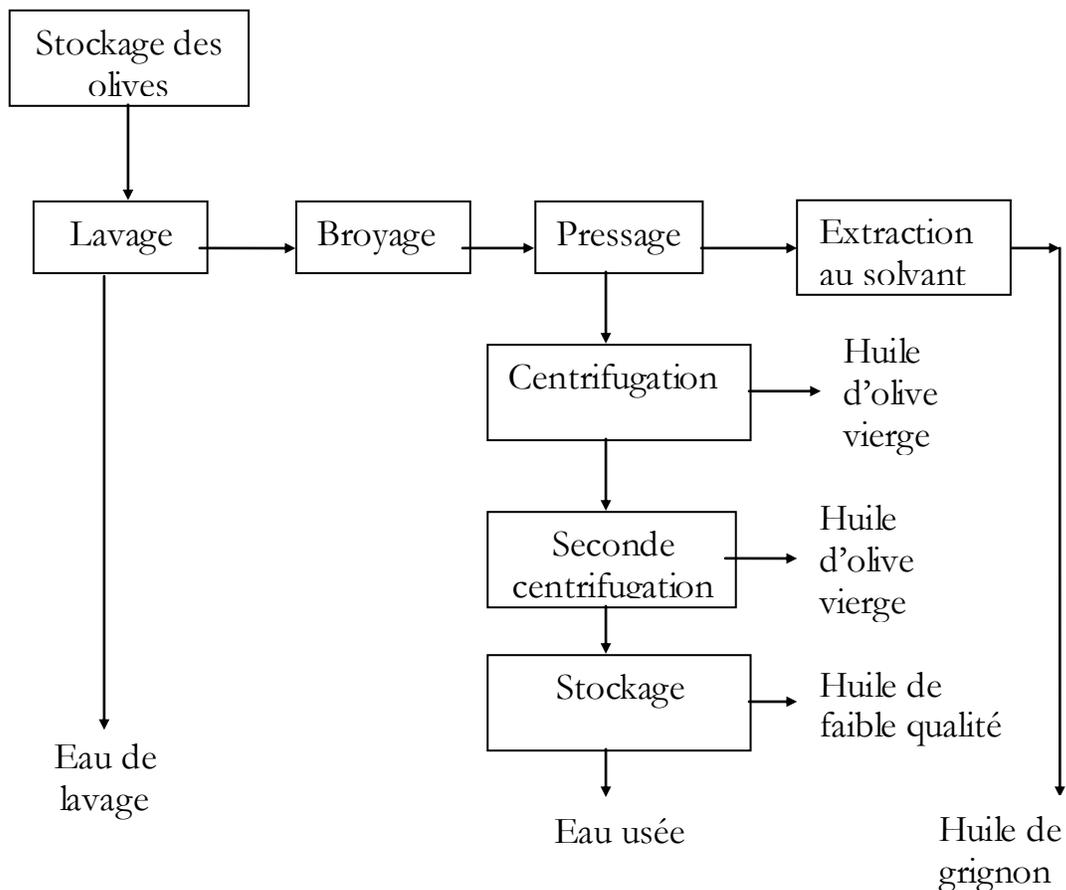


Figure 2.2: processus de production d'huile d'olive [14]

1. lavage : son but est d'éliminer les matières végétales, sables, poussières...etc.
2. Broyage : il consiste en l'éclatement de la drupe pulpeuse gorgée d'huile et concassage des noyaux pour l'obtention d'une pâte.
3. Malaxage : le but de cette opération est l'homogénéisation et le détachement des cellules lipidiques.
4. Pressage : la pâte répartie est ensuite pressée par une presse hydraulique. Le liquide obtenu constitué d'eau et d'huile est recueilli, tandis que la phase solide appelé "grignon" est rejetée.
5. Séparation : elle est effectuée par voie mécanique (décantation et centrifugation). On obtient eux phases : l'huile d'olive vierge et de l'eau appelée "margine".

2.3 Composition de l'olive

L'olive est une drupe, sa composition physique est indiquée sur la Figure 2.3.

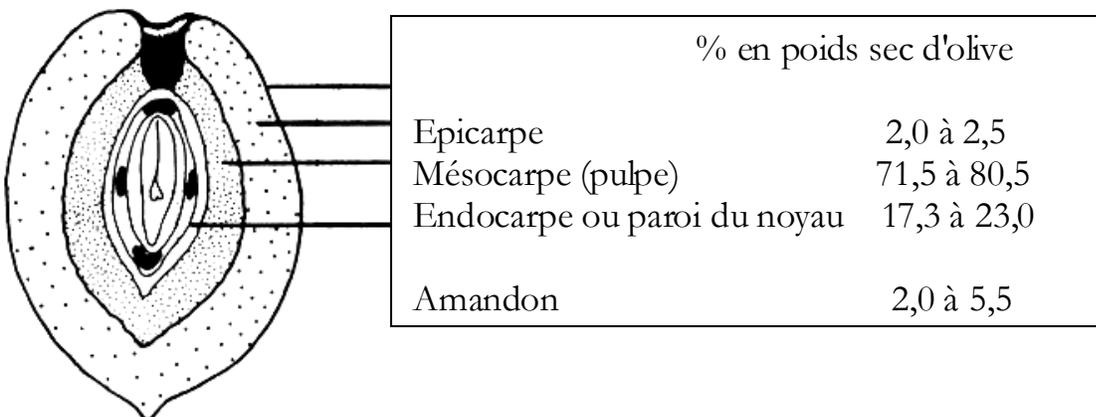


Figure 2.3 : composition physique de l'olive [15].

La composition chimique des différents constituants de l'olive est très variée.

Le tableau 2.1 nous renseigne sur la composition chimique moyenne de l'olive en fonction des différentes parties anatomiques:

Tableau 2.1 : composition chimique moyenne de l'olive en % de matière sèche [15].

Constituants	Matières grasses	M.A.T	cellulose	cendres totales
Epicarpe ou Membrane	3,40	9,80	2,40	1,60
Mésocarpe ou Pulpe	51,80	9,60	12,00	2,30
Endocarpe	0,80	1,30	74,10	1,20

M.A.T : Matières azotées totales.

2.4 Estimation quantitative des rejets d'huilerie d'olive

Le procédé classique d'extraction d'huile d'olive par pression produit en moyenne pour une quantité de 100 kg d'olives :

- 20 kg d'huile
- 40 kg de grignon
- 40 kg de margines contenant 8 à 12% d'huile ainsi que des constituants hydrosolubles de l'olive [14].

3. Les résidus lignocellulosiques

La biomasse lignocellulosique est constituée essentiellement par les parois végétales des plantes récoltées, chez lesquelles on trouve essentiellement des celluloses, des hémicelluloses et des lignines ; et grâce à un certain nombre de réactions plus ou moins spécifiques et de nature cytochimique, la mise en évidence des composés les plus fréquemment rencontrés dans les parois est désormais possible.

3.1 Composition des résidus lignocellulosiques

Chimiquement, les parois végétales comprennent trois constituants principaux

- La cellulose
- L'hémicellulose
- La lignine

3.1.1 La cellulose

C'est un biopolymère, de nature fibrillaire synthétisé dans le cytoplasme des cellules végétales, qui est déposé à l'extérieur de la membrane plasmidique, participant ainsi au maintien de la rigidité du tissu [17-18].

Le poids moléculaire minimal de la cellulose de différentes sources varie entre 50000 et 250000 Da selon les espèces, ce qui correspond à 500 jusqu'à 1500 unités de glucose. La cellulose est complètement insoluble dans l'eau [19].

3.1.2 Les hémicelluloses

Il s'agit d'une classe d'hétéropolysaccharides, associés à la cellulose par des liaisons hydrogènes, et qui, contrairement à la cellulose sont solubles dans les bases diluées (soude et potasse) [17].

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 [17][21].

3.1.3 Les lignines

Après la cellulose, la lignine est le composé le plus abondant que l'on peut extraire des membranes squelettiques. Il s'agit d'un polymère du phényle propane et des alcools P-coumarylique, coniferylique et sinapylique. Les liaisons entre motifs de base sont des liaisons stables et non hydrolysables de type, éther et carbone sans répétition régulière de structure ni éléments de symétrie connus.

Les produits de dégradation des lignines ne sont pratiquement pas fermentescibles [20-22].

3.2 Nature de la résistance structurale des constituants pariétaux

3.2.1 Effet de la structure de la cellulose sur l'hydrolyse

La cellulose étant insoluble dans l'eau et, de structure complexe, sa susceptibilité à l'attaque enzymatique dépend significativement de ses caractéristiques structurales :

- la surface spécifique
- la cristallinité

Plusieurs auteurs [23-24-25] ont mentionné que l'adsorption des molécules de l'enzyme sur la surface de la cellulose, est une phase très importante pour le déroulement du processus d'hydrolyse. L'enzyme cellulolytique commence par dégrader la cellulose amorphe (plus accessible) ; puis, la cellulose cristalline (moins accessible). Plus la cristallinité augmente et plus la cellulose devient plus résistante à la dégradation enzymatique.

D'autres auteurs [26-27-28], ont indiqué que, les caractéristiques structurales influent profondément sur les cinétiques d'hydrolyse. En effet, ces deux paramètres (surface spécifique et cristallinité) interviennent dans la détermination des vitesses initiales du processus enzymatique.

3.2.2 Effet de la structure de la lignine sur l'hydrolyse

La combinaison partielle de la lignine à la cellulose cristalline existant dans la biomasse lignocellulosique acquiert une résistance biologique très élevée. Les micro-organismes capables de dégrader la cellulose perdent cette capacité par la présence de la lignine.

La relation entre le degré de délignification et la vitesse d'hydrolyse est représentée sur la Figure 2.4.

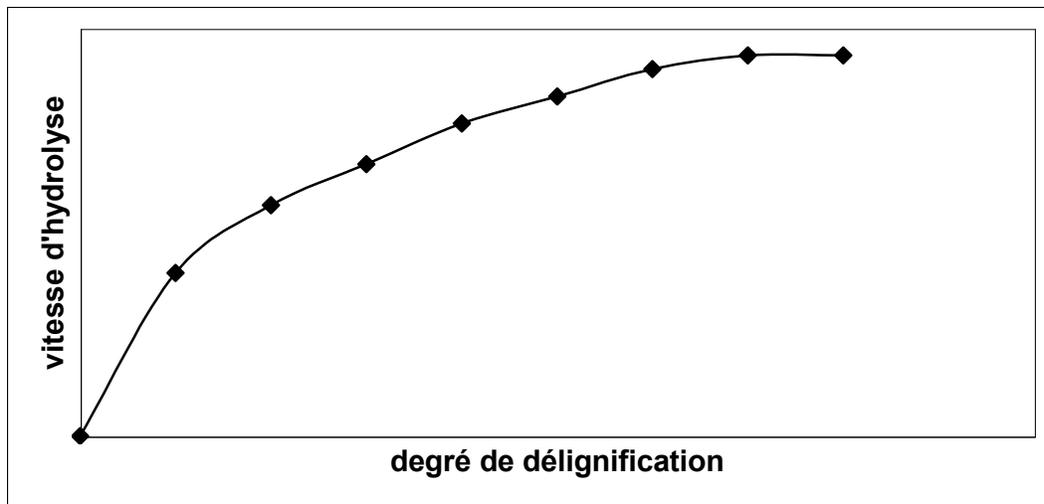


Figure 2.4 : Effet du degré de délignification sur la vitesse d'hydrolyse [26]

Fan et col.[29] ont observé que la vitesse d'hydrolyse de la paille de blé augmente considérablement avec l'augmentation du degré de délignification jusqu'à ce que celui-ci atteigne 50% ; au delà de cette valeur, ils notent une faible augmentation.

Donc :

Cellulose, hémicellulose et lignine sont, à l'état naturel, microsolubles dans l'eau. D'autre part, la cellulose, cible de l'attaque enzymatique n'est pas directement accessible aux enzymes.

Du fait de son état cristallin et de sa protection par la matrice lignine hémicellulose, la cellulose native des tissus végétaux n'est que faiblement dégradable par les enzymes cellulolytiques.

Pour obtenir une hydrolyse la plus complète possible, un prétraitement du résidu lignocellulosique serait nécessaire ; ce dernier aura pour objet de détruire toute, ou une partie, de la matrice lignine hémicellulose et d'augmenter la surface du substrat accessible aux enzymes.

4. Les prétraitements

Les constituants de la biomasse lignocellulosique (cellulose, lignine) peuvent empêcher la dégradation complète des celluloses et des hémicelluloses. Tous ces composés polymères sont physiquement entrelacés, chimiquement liés et donc peu accessibles aux enzymes.

Dés lors, dans les procédés de valorisation, la biomasse lignocellulosique subit d'abord des prétraitements destinés à améliorer son aptitude à l'hydrolyse enzymatique. Le but de ces prétraitements est donc, d'ouvrir la structure du matériel lignocellulosique qui se traduit par :

- L'augmentation de la surface
- L'élimination de la lignine
- La solubilisation des hémicelluloses.

4.1 Les différentes méthodes de prétraitement

Il existe plusieurs méthodes de prétraitement, certaines ont démontré leur efficacité dans la destruction du complexe carbohydrate-lignine, d'autres dans la destruction de la structure résistante de la cellulose.

4.1.1 Les prétraitements physiques

Ils peuvent être mécaniques et non mécaniques. Les forces utilisées dans les prétraitements mécaniques, assurent la fragmentation du matériel lignocellulosique en de fines particules, ayant un rapport surface/volume permettant une meilleure accessibilité à l'hydrolyse chimique et enzymatique. Les prétraitements non mécaniques permettent la décomposition du matériel lignocellulosique en l'exposant à des forces extérieures autres que les forces mécaniques. On distingue :

- **Le broyage** : C'est une méthode efficace. En effet, les forces de cisaillement et de compression permettent la réduction de la cristallinité, la diminution du degré de polymérisation et la diminution de la taille des particules. On distingue le broyage à boules et le broyage à marteaux [29].
- **La pyrolyse** : Il a été montré que la pyrolyse est un processus qui augmente la susceptibilité à l'hydrolyse du matériel lignocellulosique. Au delà de 300°C, la cellulose se décompose rapidement pour donner des composés gazeux. Par contre à des températures intermédiaires, la décomposition a lieu lentement et peu de produits volatils sont formés [29].
- **L'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 intense de la cellulose [29].

- **Prétraitement à la vapeur** : Cette technique est basée sur le traitement sous pression et à chaud (225°C, 25 atm.) du substrat par un liquide volatil. L'arrêt du prétraitement s'effectue par une décompression explosive pour évaporer le liquide et réduire la température. Trois phénomènes peuvent être mis en évidence au cours de ce prétraitement [17][30].
 - Une autohydrolyse due à la libération des groupements acétyles substitués sur de nombreux sucres des hémicelluloses et opérant in situ une hydrolyse partielle de ces polymères.
 - Une fusion des lignines, suivie d'une recondensation en gouttelettes au refroidissement.
 - Une destruction intense due à la libération explosive du produit, se traduit par une augmentation très importante des surfaces accessibles.

Ces trois phénomènes concourent pour améliorer la susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique du végétal traité.

La cellulose obtenue par ce procédé est presque totalement hydrolysable ; la lignine devient extractible par les solvants, tandis que les hémicelluloses sont converties en oligosides solubles.

Cette technique semble être actuellement la seule qui permet de récupérer la totalité des sucres présents dans le végétal [16].

4.1.2 Les prétraitements 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.

a) Les prétraitements alcalins :

On utilise le plus souvent, la soude caustique, le carbonate de sodium et l'ammoniaque.

Le prétraitement à la soude diluée permet l'augmentation de la surface spécifique, la diminution de la cristallinité, l'ouverture des liaisons lignine-carbohydrates et la

destruction de la structure de la lignine. Le résidu liquide obtenu est analogue aux liqueurs noires des papeteries, et pose des problèmes sévères d'élimination ou de récupération des réactifs. Le résidu solide doit être lavé et neutralisé [16].

Les résidus lignocellulosiques répondent différemment au traitement. En effet, Fan et col [29], ont observé que la digestibilité du bois tendre (quantité en lignine élevée), augmente lentement au cours du traitement à la soude, alors que celle du bois dur (quantité en lignine faible) augmente considérablement au cours du même traitement.

L'ammoniaque et le carbonate de sodium sont utilisés pour améliorer la digestibilité du matériel lignocellulosique destiné à l'alimentation des ruminants.

b) Les prétraitements acides

L'utilisation du prétraitement acide avant l'hydrolyse enzymatique n'a été étudiée que récemment. Les acides utilisés sont : l'acide sulfurique, l'acide phosphorique et l'acide chlorhydrique. Le plus souvent utilisé étant l'acide sulfurique à des concentrations de 1 à 3% ; les durées de traitements varient suivant les technologies utilisées [16].

A l'issue du traitement, l'effluent liquide renferme des sucres (essentiellement des sucres en C₅), provenant de l'hydrolyse des hémicelluloses, le résidu solide renferme la partie cellulosique et la lignine [16].

c) Les 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 alcaline (éthanol-eau), semble être un solvant sélectif pour le traitement de délignification [29-31]

4.1.3 Les prétraitements biologiques :

Ce type de prétraitements utilise des microorganismes ayant la capacité de sécréter des enzymes capables de dégrader la cellulose, les hémicelluloses et la lignine ; ce sont généralement des champignons de pourriture blanche, brune et rouge [29-32]

Le prétraitement biologique, bien que provoquant une augmentation spectaculaire de la dégradabilité de la cellulose, reste coûteux.

Toutefois, la combinaison de quelques prétraitements physiques et chimiques, donne de meilleurs résultats (par exemple broyage + prétraitement à la soude).

5. Hydrolyse enzymatique des résidus lignocellulosiques

La théorie des réactions enzymatiques est compliquée par le fait que, le poids moléculaire des enzymes mises en œuvre est très élevé, et que la structure chimique de ces agents est encore mal connue, tandis que les composés soumis aux transformations enzymatiques ont un poids moléculaire beaucoup plus faible, ce qui empêche l'étude molaire de ces phénomènes.

5.1 Les enzymes cellulolytiques:

Dans le cas de la biomasse lignocellulosique, J. Pourquie et J. Vandecastelle [16], citent deux systèmes enzymatiques, l'un spécifique aux hémicelluloses et l'autre spécifique à la cellulose.

Les enzymes spécifiques de l'hydrolyse des hémicelluloses ont été beaucoup moins étudiées que les cellulases, il est généralement admis que leur mécanisme d'action est voisin de celui des cellulases, mais leur activité spécifique leur est nettement supérieure. L'hydrolyse de la cellulose est, par conséquent l'étape limitante du processus global.

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.

Le champignon *Trichoderma reesei* est la meilleure source des cellulases extracellulaires connues jusque là, capables d'hydrolyser la cellulose en produits d'un moindre degré de polymérisation [17][33].

Le *Trichoderma reesei* est un ascomycète qui représente l'avantage d'excréter en grande quantité le mélange adéquat d'enzymes, 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 [34].

Les surnageants de culture de tels champignons, contiennent des endo-glucanases, des exo-glucanases et des β -glucosidases [34]

Les préparations obtenues avec le *Trichoderma reesei* sont beaucoup plus riches en activité β 1-4 cellobiohydrolase que l'on dose sur cellulose cristalline (cellulose microcristalline, papier filtre ou fibre de coton) [35].

Conformément à un accord international, chaque enzyme reçoit, outre un nom systématique identifiant la réaction catalysée (souvent un nom trivial), un code à quatre composants, précédé de E.C, sigle de " enzyme classification".

Le système enzymatique cellulolytique est un complexe formé de trois différents types d'enzymes:

5.1.1 L'endo-glucanase (1-4- β -D- glucane glucohydrolase: E.C.3.2.14):

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, mais dans certains cas il est voisin de 13000 daltons [17][36].

Les endo-glucanases opèrent d'une façon aléatoire en réalisant des coupures à l'intérieur de la chaîne de la cellulose et créent de nouveaux sites d'attaque pour les exo-glucanases [36].

5.1.2 L'exo-glucanase (1-4- β -D-glucane cellobiohydrolase E.C.3.2.91):

Les exo-glucanases attaquent la molécule de la cellulose en bout de chaîne, du côté non réducteur, en libérant des résidus cellobiose, elles sont alors appelées cellobiohydrolase (CBH= β -1-4 glucane 4 cellobiohydrolase), ou bien en libérant du glucose, elles sont alors appelées glucohydrolase (GH= β -1-4 glucane 4 glucohydrolase). Elles sont généralement capables d'attaquer les cellodextrines, la cellulose microcristalline, et les fibres du coton [17][36].

5.1.3 Cellobiase (β -D glucoside-glucohydrolase E.C.3.2.21) :

Les cellobiases libèrent du glucose à partir des oligomères libérés par l'action d'endo et ou /d'exo-glucanases. Leur affinité pour leur substrat augmente

lorsque le degré de polymérisation décroît, et présente un maximum pour le cellobiose d'où le nom de cellobiases fréquemment utilisé [36-37].

La stabilité et l'activité maximale de ce complexe sont atteintes à pH = 5 et à une température égale à 50°C.

5.2 La régulation enzymatique

L'activité du complexe cellulolytique est soumise à une régulation précise à travers les inhibitions subies par chacun des constituants. En effet, ces enzymes sont compétitivement inhibées à chaque stade du processus d'hydrolyse par l'accumulation des produits d'hydrolyse, ce qui retarde progressivement la saccharification [17].

Les exo-glucanases sont inhibées par le cellubionolactone. Le glucose est aussi inhibiteur, mais c'est le cellobiose, inhibiteur compétitif qui influe le plus sur cette activité. Quant aux cellobiases, elles sont très fortement inhibées par le gluconolactone, le glucose provoque aussi une inhibition compétitive mais plus faible [17-18].

De nombreuses endo-glucanases sont notablement affectées par le cellobiose. Celui-ci est aussi le principal inhibiteur de l'action coopérative des endo et exo-glucanases [28]. Les principaux régulateurs sont donc le glucose et le gluconolactone pour les β -glucosidases, et le cellobiose pour les endo et exo-glucanases.

Ces inhibitions dues aux produits des réactions catalysées, montrent tout l'intérêt qui réside dans l'isolement de souches, dont les enzymes ne sont pas soumises aux rétro-inhibitions pour augmenter le taux de dégradation de la cellulose [17].

6. Matériels et méthode

6.1 Enzyme et substrat

Une enzyme commerciale de *Trichoderma reesei* (sigma France) est utilisée au cours de nos essais. Elle est vendue sous forme de poudre lyophilisée. L'enzyme présente une activité de 5,08 unités /mg (une unité libère 1 μ mole de glucose à partir de cellulose en 1heure à pH5 et T =37°C après un temps d'incubation de 2 heures).

Les solutions d'enzymes de concentrations allant de 0,5 à 6g/l sont préparées dans une solution tampon acide acétique/acétate de sodium (0,05M à pH5).

Le substrat est un résidu solide (grignon) prélevé directement au moulin de l'huilerie ; il est produit dans la région de Tadmait, durant la campagne oléicole de 1995 à 1998 et est transporté au laboratoire à 4°C. Bien que le résidu solide ait été préalablement concassé lors de la production d'huile, cette matière est de nouveau réduite à une granulométrie d'environ 460µm et séchée à 70°C.

Les principales caractéristiques du matériau lignocellulosique sont données dans le tableau 2.2

Tableau 2.2 : Composition chimique du résidu solide de moulin d'huile avant et après traitement à la soude NaOH ^(a)

Paramètres	Résidu brut %	Résidu traité %
Matières sèches	89,11	84,22
Matières sèches	04,78	10,28
Matières grasses	11,73	08,94
Azote total	07,32	06,67
Cellulose brute	46,24	42,53
Hémicellulose	23,83	00,17
Lignine	19,89	00,151
Potassium	00,098	10,25
Sodium	00,19	13,07

(a) Concentrations exprimées en pourcentage de matières sèches.

Afin d'améliorer la réaction de saccharification, un traitement chimique avec de l'hydroxyde de sodium est effectué à des concentrations allant de 0 à 0,2g/g de grignon et à des températures allant de 50°C à 120°C avant la conversion en sucre.

Le résidu solide est également rincé à l'eau distillée jusqu'à atteindre un pH neutre. Enfin il est séché à 70°C pendant 24h.

Le substrat est ensuite introduit dans des erlenmeyers de 500ml contenant de l'eau distillée de manière à avoir des concentrations allant de 10 à 200g/l.

Les conditions optimales de saccharification sont déterminées pour les différents paramètres suivants : Température, concentrations en substrat et concentrations en enzyme.

6.2 Méthodes analytiques

- La cellulose brute correspondant au résidu organique insoluble obtenu après attaque acide (H_2SO_4 , 0,26N) et alcaline (NaOH , 0,313N) est analysée conformément à la norme ISO-AFNOR (NFV0340, 1977). Cette technique consiste à écraser 3g du résidu organique et à le soumettre aux milieux acide et alcalin, précédemment cité, pendant 30 minutes dans chaque cas. La solution est filtrée et lavée avec de l'eau chaude. Le résidu solide est ensuite séché à 130°C pendant 1 heure, et la masse du produit P_1 est déterminée. Le produit est chauffé une seconde fois à 550°C pendant 1 heure et la masse du produit restant P_2 est déterminée. La différence entre P_1 et P_2 divisée par la masse du résidu organique initial (3g) permet de déterminer le pourcentage de la cellulose brute contenu dans ce matériau.
- La teneur en composés pariétaux (cellulose, hémicellulose et lignine) est déterminée en divisant le matériau naturel en trois fractions [38]:
 1. NDF (neutral detergent fiber) qui constitue l'essentiel de la paroi végétale.
 2. ADF (acid detergent fiber) qui correspond à la ligno-cellulose.
 3. ADL (acid detergent lignine) qui correspond à la lignine.

Un gramme du résidu organique est traité par des solutions spécifiques (mélange de sulfate dodécylque de sodium, EDTA, phosphate disodique, éthoxyéthanol en milieu aqueux dans lequel du sulfite de sodium est ajouté pour la détermination du détergent neutre et une solution de bromure d'éthyltriméthylammonium en milieu sulfurique pour le détergent acide).

Toutes les solutions ont un volume égal à 0,1 litres. Les solutions sont ensuite bouillies durant 1 heure et filtrées. Le résidu solide récupéré est séché à température modérée et pesé ; sa masse est P_1 .

L'échantillon est ensuite soumis à haute température et pesé ; sa masse est P_2 . La différence entre P_1 et P_2 divisée par la masse du résidu organique initial (1g) permet de déterminer le pourcentage des composés pariétaux contenu dans le matériau.

- L'analyse des sucres est réalisée en utilisant le test standard au di-nitro-salicylique (DNS) [39]. Cette méthode est basée sur la formation du chromophore entre le produit de DNS et les groupes de molécules de sucres réduits.

- La concentration de glucose est déterminée par la technique enzymatique à la glucose oxydase/ peroxydase [40]. La glucose oxydase catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique.
- L'activité enzymatique du *T. reesei* est déterminée par la méthode développée par Mandels et Andreotti [41], avec du papier filtre wattman numéro 1 comme substrat standard. Nous avons utilisé deux dilutions en ce qui concerne la solution enzymatique. La première permet d'obtenir plus que 2mg/l de glucose. La seconde donne moins que 2mg/l de glucose. Le temps d'incubation est de 1 heure à 50°C. La réaction enzymatique est stoppée par le produit de DNS.
- Le rendement de saccharification est déterminé en calculant le pourcentage de cellulose hydrolysée par rapport à la quantité totale disponible dans le matériau.

7. Résultats et discussion

La composition chimique du grignon d'olive brut indique que la teneur des composés pariétaux s'avère être du même ordre de grandeur que celle obtenue pour le foin, mais inférieure aux valeurs obtenues pour la paille [42]. Il est, par ailleurs, important de noter que quoique la teneur en matières azotées eu été estimée être correcte pour l'alimentation, la capacité nutritive et énergétique du résidu solide (grignon) est trop faible car 90% de l'azote total se retrouve dans la fraction lignocellulosique. Ceci témoigne donc de la faible valeur énergétique de ce substrat.

La fraction carbone hydratée (cellulose et hémicellulose) représente le principal composant du grignon d'olive (tableau 2.2). Ce matériau semblerait être intéressant pour la production de sucres par procédé enzymatique.

7.1 Prétraitement du résidu brute

L'effet de la température sur la performance du prétraitement alcalin peut être suivi en tenant compte de la production de sucre qui en découle après prétraitement (Figure 2.5).

Il apparaît que l'optimum de la température est de l'ordre de 100°C. A cette température, il est possible d'obtenir une forte concentration de sucre réducteur en une période d'une heure.

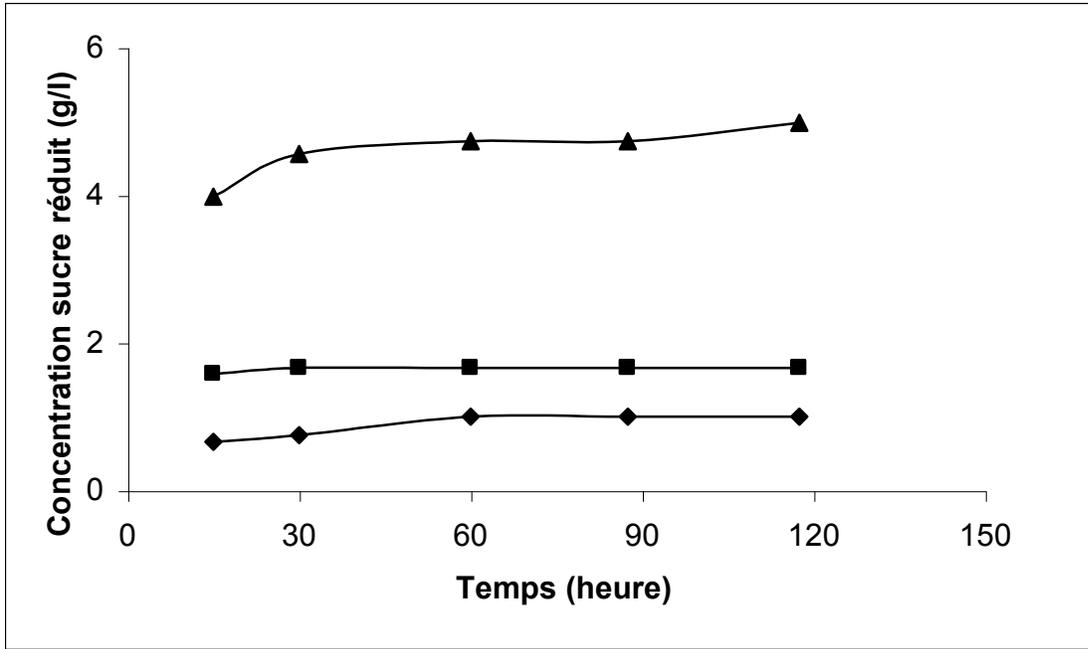


Figure 2.5: Effet de la température dans le prétraitement alcalin sur la concentration en sucre réduit; $R = 10 \text{g grignons (g NaOH)}^{-1}$, $v = 250 \text{ tpm}$, $T_e = 50^\circ\text{C}$, et $E/S = 0.08 \text{g enzymes (g grignon)}^{-1}$. (◆) $T_p = 50^\circ\text{C}$; (■) $T_p = 120^\circ\text{C}$; (▲) $T_p = 100^\circ\text{C}$.

L'effet du rapport massique, entre la masse du résidu et celle de NaOH sur la performance du prétraitement, est représenté sur la Figure 2.6.

Il apparaît, d'une part qu'un rapport optimal R égal à 20 conduit à des teneurs élevées en sucres et, d'autre part que l'état d'équilibre est atteint au bout d'une heure.

Les conditions optimales retenues après prétraitement du matériau brut seraient donc une température égale à 100°C , un rapport $R = 20 \text{g de résidu solide /g de NaOH}$ et un temps d'expérimentation de 1 heure.

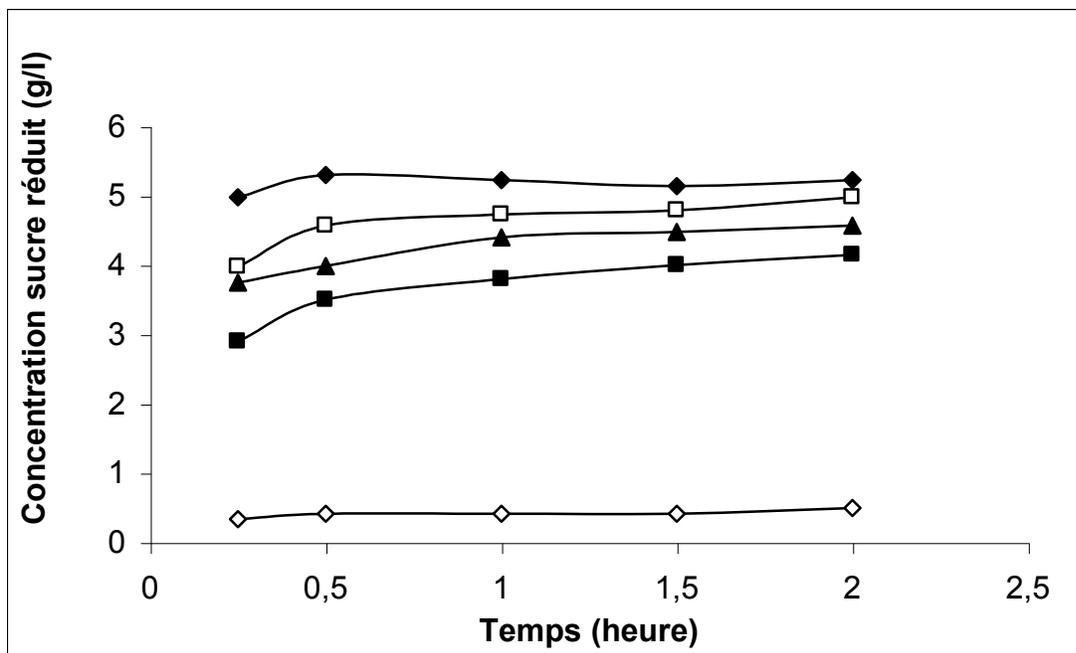


Figure 2.6 : Effet du rapport R sur la concentration en sucre réduit; $T_p=100^\circ\text{C}$, $v=250\text{rpm}$, $T_c=50^\circ\text{C}$ et $E/S=0,08\text{g enzymes (g NaOH)}^{-1}$.
 (◇) Sans addition de NaOH ; (■) 40g grignons/g NaOH ; (▲) 30g grignons/g NaOH ; (◻) 10g grignons/g NaOH ; (◆) 20g grignons/g NaOH.

7.2 Optimisation de la saccharification enzymatique du résidu solide

Dans un premier temps, la saccharification enzymatique est réalisée, en déterminant l'activité de la cellulase dans les conditions standards. L'optimisation de l'hydrolyse a été réalisée en déterminant les performances de l'enzyme aux différents paramètres opératoires.

L'effet du pH sur l'activité de l'enzyme est représenté sur la Figure 2.7.

Il apparaît que l'activité maximale est obtenue à pH5. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus antérieurement, utilisant le *Trichoderma reesei* dans l'hydrolyse du matériau cellulosique [43-44]. De nos expériences, il apparaît que l'optimum du pH se situe dans une fourchette allant de 3,8 à 5,2.

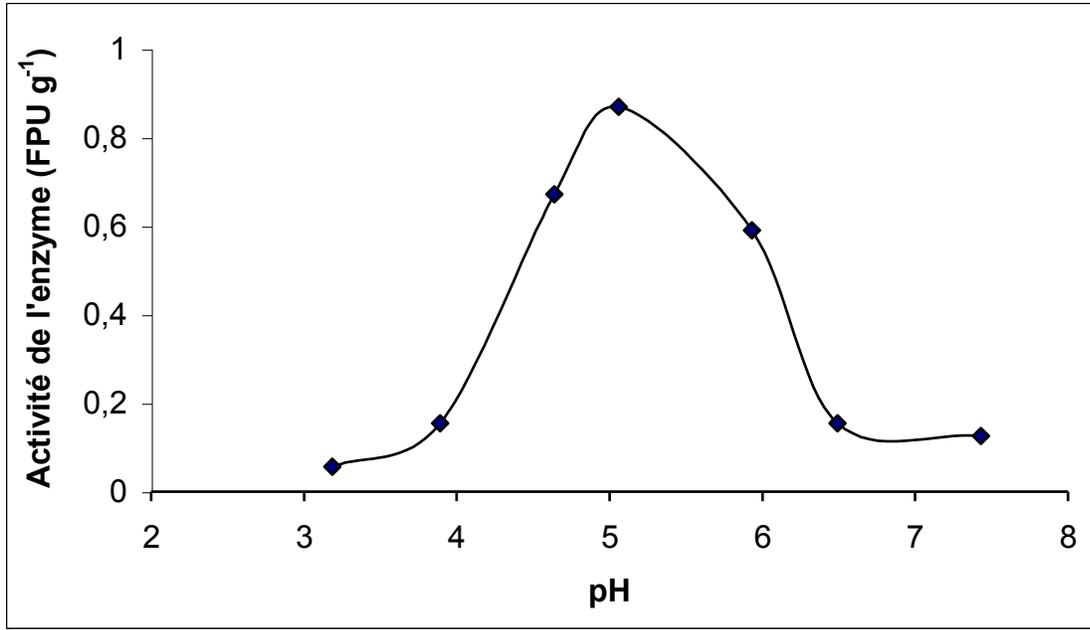


Figure 2.7 : Effet du pH sur l'activité de l'enzyme; $T = 50^{\circ}\text{C}$, $v = 250$ tpm et conditions standards [41].

L'effet de la température sur l'activité de l'enzyme est représenté sur la Figure 2.8. Il apparaît que l'optimum de la température se situe à 50°C . Ce résultat est également en accord avec les travaux antérieurs [43-44]

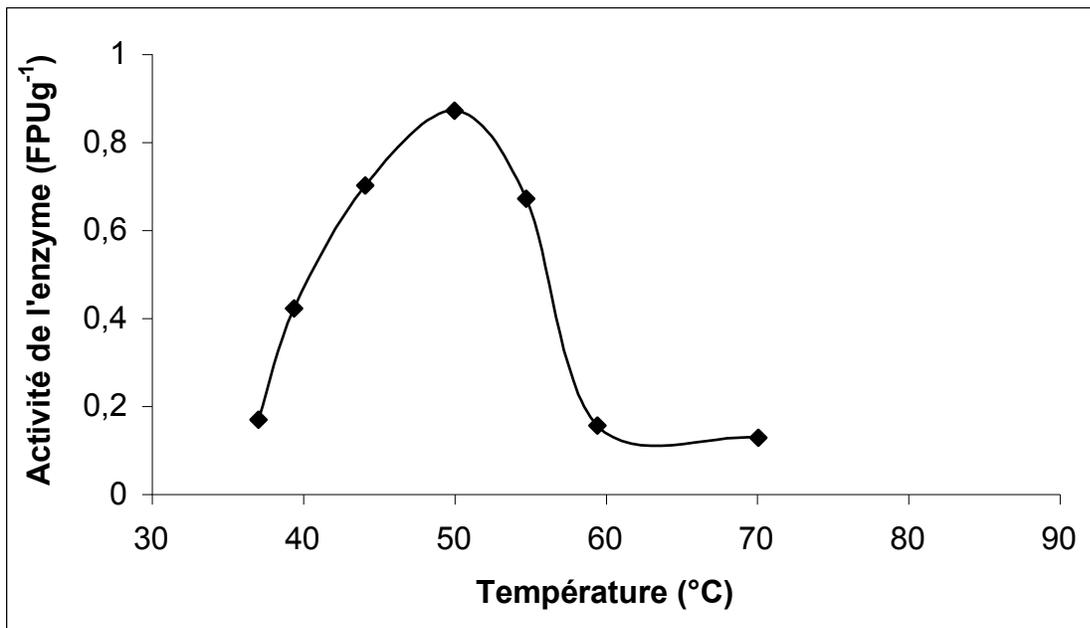


Figure 2.8: Effet de la température sur l'activité de l'enzyme; $\text{pH} = 5$, $v = 250$ tpm, et conditions standards [41].

Il est important de noter, qu'en milieu biologique (par exemple en solution enzymatique) les effets des conditions expérimentales (stress, température) conduisent à une dénaturation de l'enzyme [45-47].

Afin d'évaluer les possibilités de dénaturation de l'enzyme, l'activité résiduelle de l'enzyme est déterminée. Elle représente le rapport de l'activité de l'enzyme à la température de l'essai et l'activité de l'enzyme à température ambiante ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Ces résultats sont regroupés sur la Figure 2.9. On note :

- Une rapide décroissance de l'activité de l'enzyme pour des températures supérieures à 50°C .
- Un abattement de l'activité de l'enzyme de 70% après 5 heures à une température de 60°C .
- Une augmentation de la température induit une décroissance de l'activité résiduelle qui atteint une valeur de 7% après 5 heures.

En ce qui concerne la température optimale égale à 50°C précédemment déterminée, l'activité enzymatique semble non affectée, et l'activité résiduelle serait supérieure de 80% à l'activité de l'enzyme à température ambiante après une durée excédant 5 heures. Ces résultats confirment le rôle important de la température dans les processus enzymatiques. L'enzyme de *Trichoderma reesei* devrait être utilisée dans la bioconversion du résidu solide de grignon d'olive en sucre dans les conditions optimales ($T=50^{\circ}\text{C}$ et $\text{pH}5$)

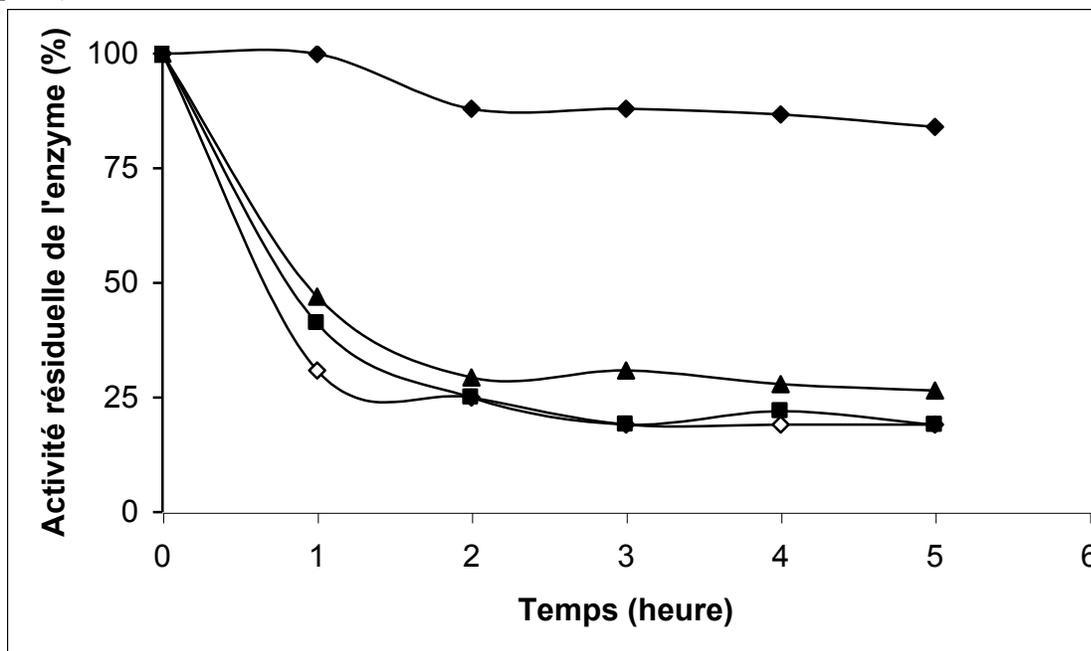


Figure 2.9 : Variation de l'activité résiduelle de l'enzyme à différentes valeurs de la température; $\text{pH} = 5$, $v = 250$ tpm, et conditions standards [41] ; (\diamond) $T_c = 80^{\circ}\text{C}$; (\blacksquare) $T_c = 70^{\circ}\text{C}$; (\blacktriangle) $T_c = 60^{\circ}\text{C}$; (\blacklozenge) $T_c = 50^{\circ}\text{C}$.

Afin de déterminer l'effet du prétraitement alcalin sur le rendement de saccharification, nous comparons les résultats obtenus lors de l'hydrolyse du grignon d'olive prétraité avec ceux du grignon brut et cela aux conditions optimales préalablement citées (Figure 2.10).

Les résultats obtenus indiquent, qu'un prétraitement alcalin améliore considérablement le rendement de saccharification avec une augmentation de 20 à 50% à l'état d'équilibre.

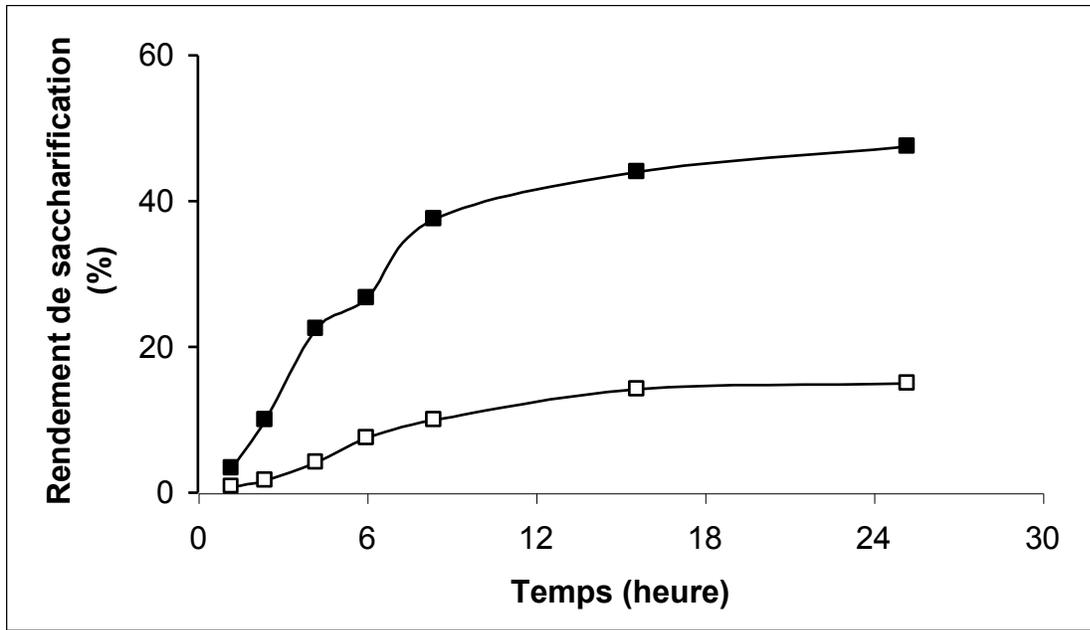


Figure 2.10 : Effet du prétraitement alcalin sur le rendement de saccharification; pH=5, E/S= 0.125g enzymes (g grignon)⁻¹, v = 250 tpm et T_c= 50°C. Matériau prétraité à R= 100g grignons (g NaOH)⁻¹ et T_p = 100°C.
 (□) Matériau brut ; (■) Matériau prétraité.

L'effet du rapport massique E/S, rapport de la masse d'enzyme et de celle du substrat variant entre 0,02 à 0,4g d'enzyme par gramme de résidu solide, sur la performance de la réaction de saccharification, est illustré sur la Figure 2.11a.

Nous remarquons que pour le rapport E/S = 0,02, il se produit un démarrage régulier pendant les 3 premières heures. Il est plus lent pour les valeurs de E/S moyennement grandes. Il est inexistant pour les valeurs plus grandes.

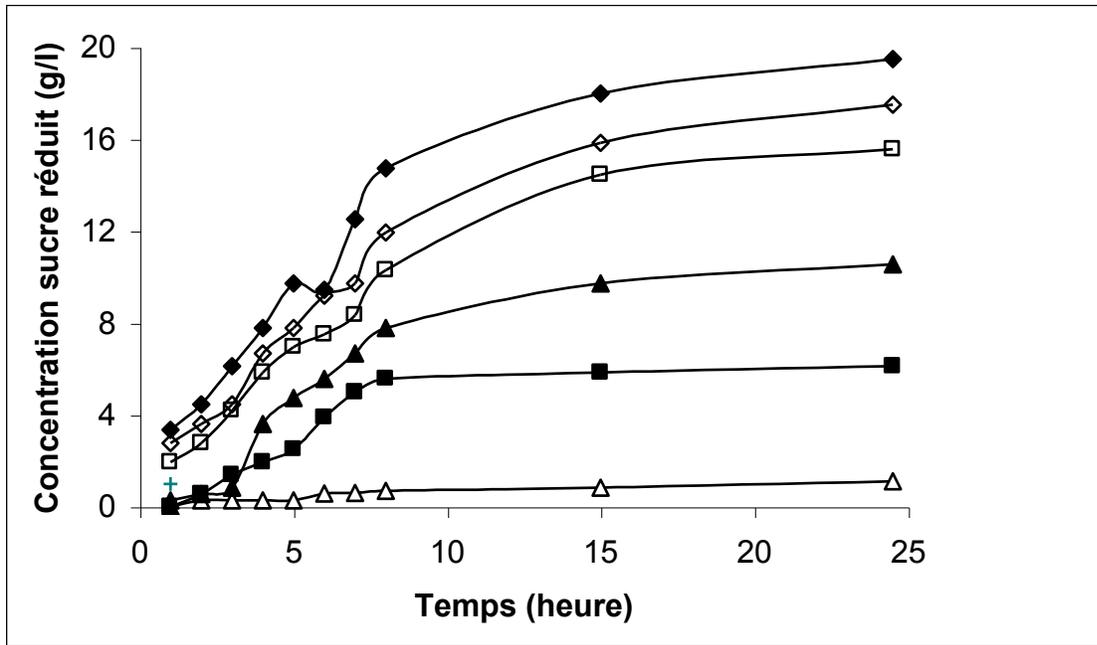


Figure 2.11a : Effet du rapport E/S sur la concentration en sucre réduit; pH=5, $v = 250$ tpm et $T = 50^{\circ}\text{C}$; (◆) E/S=0,02 ; (◇) E/S=0,03 ; (□) E/S=0,06 ; (▲) E/S=0,12; (■) E/S=0,2 ; (Δ) E/S=0,4

Les rendements de saccharification obtenus après 24 heures d'essai pour les différentes valeurs du rapport E/S considérés sont illustrés sur la Figure 2.11b.

Ces résultats indiquent que le rapport E/S = 0,1g d'enzyme/g de résidu solide correspond au rendement maximum de saccharification. Celui-ci est de 50% dans les conditions optimales.

Ces résultats seront comparés à ceux concernant la saccharification du matériau lignocellulosique puisque la littérature se rapportant à la saccharification des résidus solides du grignon d'olive est inexistante.

Il apparaît que les rendements sont du même ordre de grandeur que dans les études antérieures utilisant différents types d'enzymes de *Trichoderma reesei* dans des saccharifications de 24 heures [49-51].

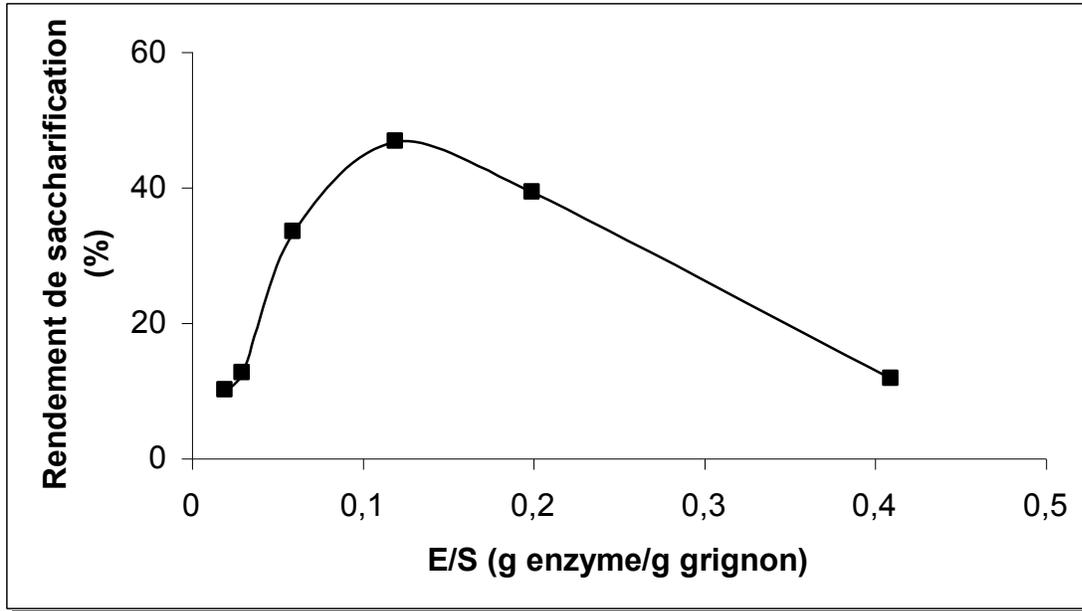


Figure 2.11b : Variation du rendement de saccharification en fonction de E/S; pH=5, $v = 250$ tpm et $T = 50^{\circ}\text{C}$.

L'effet du rapport E/S sur le rendement du glucose est représenté sur la Figure 2.11c. Ces résultats indiquent que le rapport optimum E/S dans la production du glucose serait de l'ordre de 0,1g d'enzyme/g de grignon d'olive.

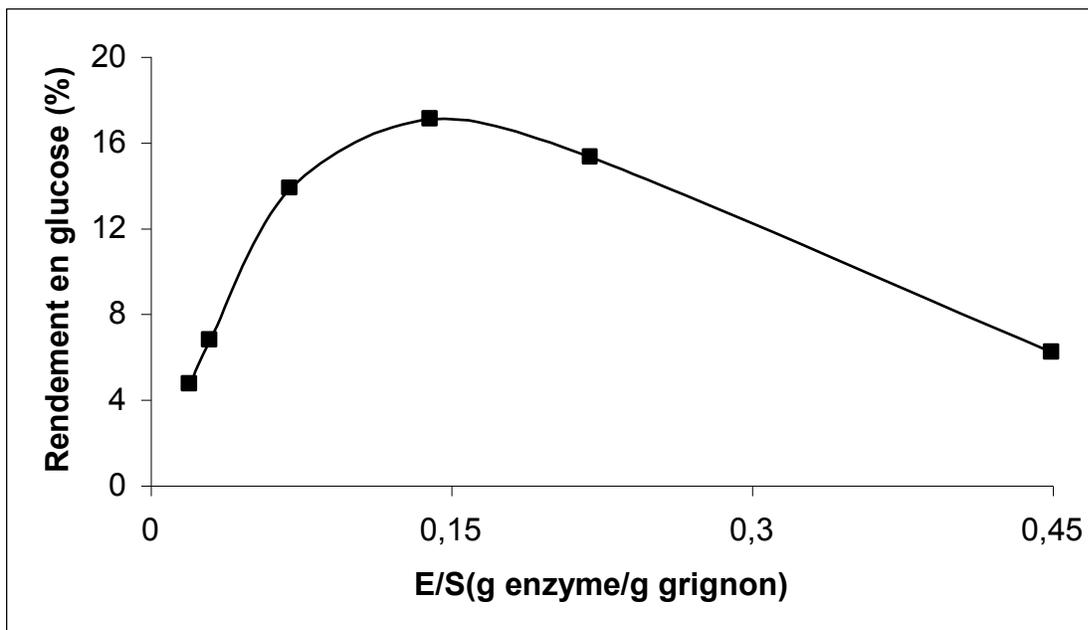


Figure 2.11c : Effet de E/S sur le rendement en glucose; pH=5, $v = 250$ tpm et $T = 50^{\circ}\text{C}$.

La représentation double inverse de Lineweaver-Burk conduit aux conditions cinétiques : $K_m = 800\text{g/l}$ et $V_m = 0,1\text{g/l/min}$, obtenus en réacteur batch (Figure 2.11d).

Ces résultats sont en accord avec la formule de Lineweaver-Burk pour les basses concentrations en substrat, la vitesse initiale croît progressivement et atteint une valeur maximale. Inversement, une concentration élevée en substrat (supérieure à 40g/l) provoque une diminution de la vitesse initiale. Il semblerait qu'il y ait effet d'inhibition par le substrat.

Les constantes cinétiques déterminées sont des constantes apparentes puisque la formule de Lineweaver-Burk est basée sur un modèle simple qui ne prend pas en compte l'inhibition de l'enzyme causée par les variations de paramètres.

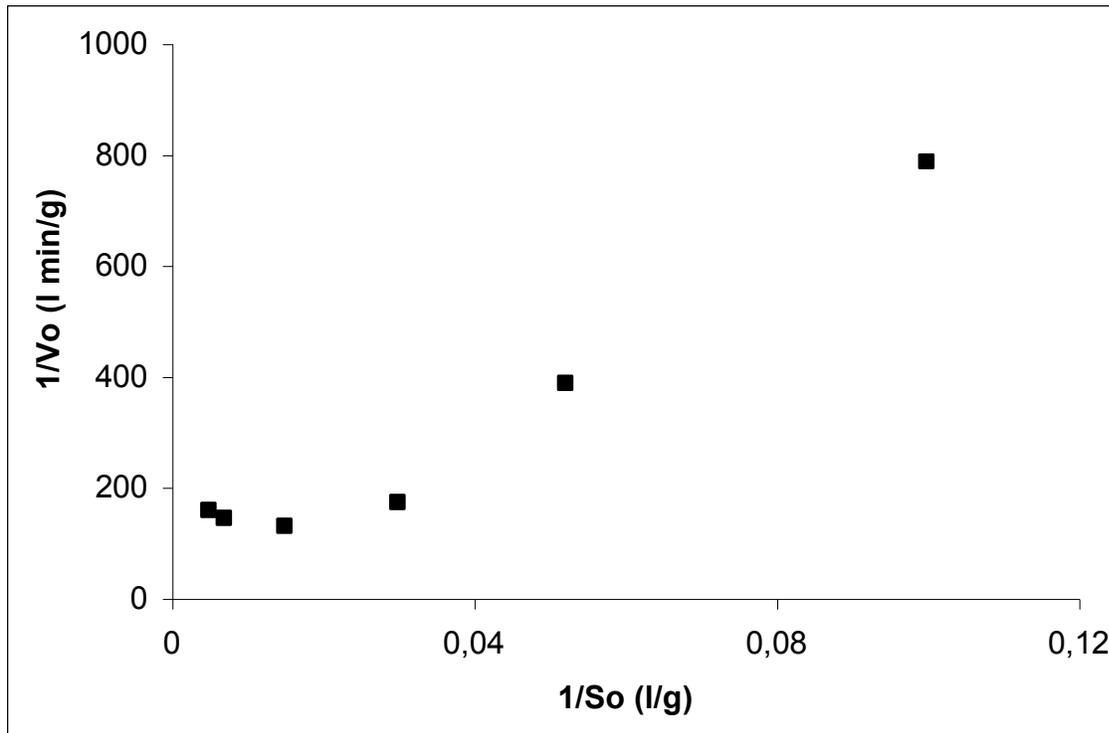


Figure 2.11d : Représentation double inverse de Lineweaver-Burk; $C_E = 4\text{g/l}$, $T = 50^\circ\text{C}$ et $\text{pH} = 5$.

L'effet que produit la saccharification sur l'inhibition de l'enzyme est illustré par deux expérimentations successives.

La première consiste à hydrolyser le grignon d'olive aux conditions optimales jusqu'à atteindre l'état d'équilibre à 24 heures ; ensuite le résidu solide est extrait et rincé à l'eau distillée.

Ce résidu est ensuite soumis à une deuxième saccharification en présence d'enzyme fraîche.

Les résultats obtenus sont illustrés sur la Figure 2.12.

Ils indiqueraient que les sucres sont continuellement produits durant la seconde expérimentation. Ceci montre que le phénomène d'inhibition se produit durant la première expérimentation.

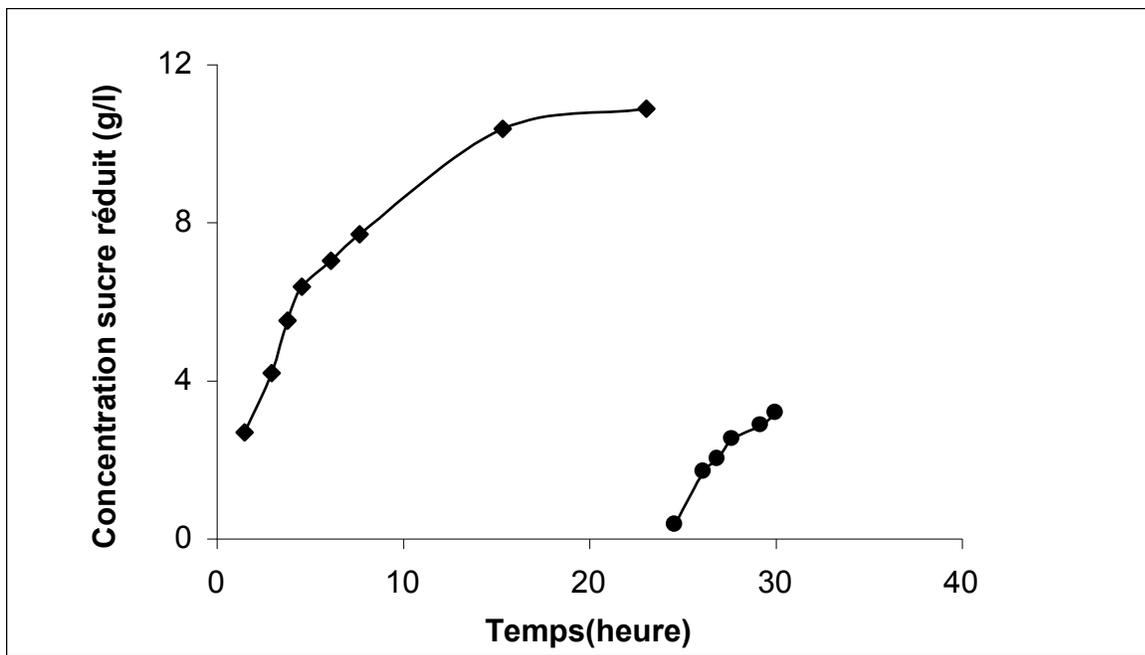


Figure 2.12 : Effet des produits résultants de la réaction enzymatique sur l'inhibition de la saccharification du grignon d'olive; $E/S=0.1$ g enzymes (g grignon)⁻¹, $T= 50^{\circ}\text{C}$, $v = 250$ tpm et $\text{pH} = 5$.

Des résultats similaires sont obtenus avec du matériau lignocellulosique conduisant à une décroissance de la grande vitesse du substrat qui, pourrait être attribuer au changement de la capacité de l'enzyme et de la réactivité du substrat [52].

Par ailleurs, les produits de la saccharification du résidu solide (grignon d'olive) particulièrement le cellobiose, considéré comme un fort inhibiteur enzymatique pourrait influencer la réaction enzymatique.

8. Conclusion

La saccharification enzymatique est réalisée en présence de l'enzyme de *Trichoderma reesei*, après prétraitement alcalin du substrat.

Les conditions optimales de prétraitement ($T = 100^{\circ}\text{C}$, $R = 20\text{g}$ de résidu solide/g de NaOH) accélèrent la saccharification d'un facteur de 2,5 comme le montre le rendement de saccharification.

Les conditions optimales de la saccharification enzymatique sont : $\text{pH}5$, $T = 50^{\circ}\text{C}$ et $E/S = 0,1\text{g}$ d'enzyme/g de résidu solide, conduisant à un rendement de 50%.

Le ralentissement de la courbe au bout de 24 heures en ce qui concerne la réaction enzymatique ainsi que le suivi des performances de la saccharification du grignon d'olive sont du même ordre de grandeur que ce qui avait été obtenu antérieurement dans l'étude de la saccharification du matériau lignocellulosique.

Le phénomène d'inhibition rencontré durant la réaction enzymatique serait surtout attribué aux produits de la réaction. Par ailleurs, l'utilisation de réacteur continu à membrane pourrait apporter une solution à ce problème.

C'est ainsi donc, qu'il a été envisagé en vue d'améliorer le rendement de saccharification de la cellulose en glucose, de coupler le réacteur enzymatique à une technique membranaire à savoir : l'ultrafiltration, pour la séparation des sucres de l'enzyme. Ces travaux ont fait l'objet du deuxième volet de notre étude sur la saccharification des grignons d'olive que nous présentons ci après.

PARTIE 2 VOLET 2

HYDROLYSE ENZYMATIQUE D'UN REJET D'HUILERIE DANS UN REACTEUR A MEMBRANE

1. Introduction

L'hydrolyse enzymatique effectuée en batch est un des processus biologiques impliquant des coûts élevés dus à la grande quantité d'enzyme utilisée, à l'énergie requise, au temps de réaction suffisamment long, au grand volume de réacteur exigé, aux pertes d'enzyme après inactivation à la fin de la procédure [53-55].

Le développement de la technologie des membranes minérales a amélioré l'utilisation de l'hydrolyse enzymatique dans un bioréacteur continu à membrane puisque ces membranes résistent à des températures excédant 60°C dans une gamme étendue de pH(1-14) et peuvent être stérilisées après chaque utilisation. Dans ce cas, l'enzyme est recyclée et réutilisée, alors que le produit de l'hydrolyse enzymatique est continuellement retiré en tant que perméat [56].

Henley et col ont étudié la saccharification enzymatique de divers matériaux lignocellulosiques avec l'enzyme de *Trichoderma viride* qui serait très efficace couplée à une technique d'ultrafiltration [57].

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation de membranes avec un seuil de coupure de 50kDa permet d'éviter l'effet d'inhibition par extraction continu des produits formés lors de la réaction de saccharification.

Alfani et col. [58] utilisent deux réacteurs en série pour la saccharification enzymatique des résidus solides agricoles. Le premier est un réacteur à membrane dans lequel la cellulose est préalablement traitée et convertie en cellobiose. Dans le second réacteur, le cellobiose produit est complètement converti en glucose par la β -glucosidase. Ils ont trouvé dans les deux cas des cinétiques Michaeliennes.

La saccharification de l'amidon de farine de manioc avec l'enzyme glucoamylase d'*Aspergillus niger* a été étudiée dans des réacteurs enzymatiques à membranes en fibres creuses. Le substrat a été préalablement gélatiné par extrusion rendant ainsi possible la formation d'un produit pur dans le perméat (c'est à dire 99,6%de glucose) avec la conversion de l'amidon (97,3% de glucose) [59].

Dans les travaux précédents [48] la saccharification du résidu solide des rejets d'huilerie en réacteur batch par l'enzyme de *Trichoderma reesei* est réalisée dans les conditions optimales : pH = 5, T=50°C et E/S =0,1g d'enzyme par g de résidu solide. Le rendement maximal de saccharification obtenu dans les conditions optimales est de 50% et l'état d'équilibre est atteint au bout de 24 heures. Pendant la réaction de

saccharification, il est apparu des phénomènes d'inhibition qui seraient attribués principalement aux produits de la réaction.

L'utilisation des bioréacteurs continus à membranes pourrait résoudre ce problème. La présente étude se rapporte à la saccharification enzymatique d'un résidu solide de rejet d'huilerie dans un bioréacteur équipé de membranes d'ultrafiltrations minérales.

2. Bioréacteur à membrane continu

Le bioréacteur continu à membrane est illustré sur la Figure 3.1

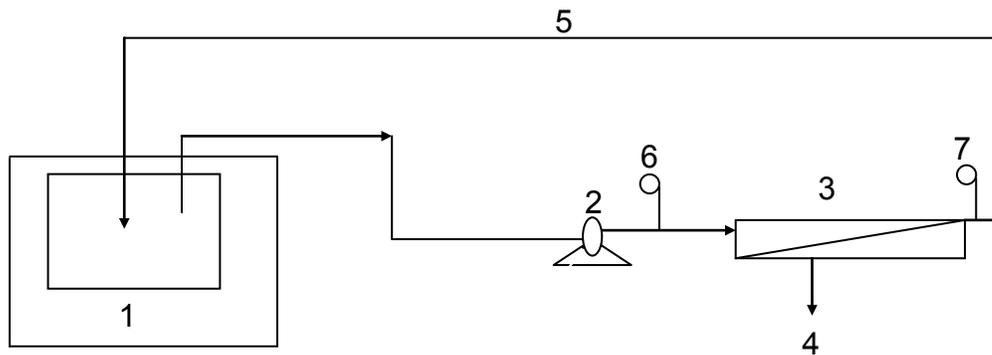


Figure 3.1 : Schéma du bioréacteur continu à membrane

(1) réacteur ; (2) pompe d'alimentation ; (3) cellule d'ultrafiltration ; (4) perméat ; (5) boucle de recyclage ; (6) et (7) manomètres.

Avant la saccharification enzymatique le matériau lignocellulosique brute est soumis à un traitement alcalin avec NaOH. Les conditions optimales de prétraitement (température $T = 100^{\circ}\text{C}$, $R = 20$ g du résidu solide / g de NaOH) sont déterminées au cours d'études précédentes [48].

Après mélange dans de l'eau distillée (avec un agitateur magnétique à 500rpm), les conditions expérimentales utilisées correspondent aux valeurs des paramètres précédemment déterminés dans les conditions optimales de saccharification en réacteur batch [48]

La saccharification enzymatique du résidu solide des rejets d'huilerie est réalisée en batch, par un premier chargement du bioréacteur (Setric 21, Toulouse, France) avec la quantité de substrat exigée ($E/S = 0,1\text{g}$ d'enzyme/g de résidu solide). Après ajustement de la température et du pH aux valeurs optimales [48] (50°C et pH5) dans le réacteur1, l'enzyme de *Trichoderma reesei* est introduite. La réaction en batch dure 6 heures, après quoi l'hydrolysât est traité dans le bioréacteur continu à membrane. La saccharification enzymatique du résidu solide a été réalisée. Durant la première demi-

heure, le bioréacteur continu à membrane fonctionne en faisant recirculer le perméat (c'est à dire que le perméat retourne dans le réacteur 1). Le recyclage du perméat est ensuite stoppé, et une solution fraîche est pompée dans le réacteur 1 à une vitesse égale au flux du perméat. Un volume de réaction constant est fixé pendant les expériences.

Le module de membrane est équipé d'une membrane d'ultrafiltration Carbosep M5 de seuil de coupure 10kDa. La membrane Carbosep est composée de pores de ZrO_2 soutenu sur du carbone poreux. La surface de filtration du module est de $0,012m^2$.

La perméabilité hydraulique de la membrane M5 à l'eau préfiltrée est de $40 l/h.bar. m^2$. La filtration est réalisée sous une valeur moyenne de la pression transmembranaire $(P_1+P_2)/2$ allant de $0,5 \times 10^5 - 2,5 \times 10^5 Pa$.

3. Méthodes Analytiques

- La cellulose brute correspondant au résidu organique insoluble obtenu après attaque acide (H_2SO_4 , 0,26N) et alcaline (NaOH, 0,313N) est analysée conformément à la norme ISO-AFNOR (NFV0340, 1977).
- La teneur en composés pariétaux (cellulose, hémicellulose et lignine) est déterminée par fractionnement du matériau naturel [38].
 - NDF (neutral detergent fiber) qui constitue l'essentiel de la paroi végétale.
 - ADF (acid detergent fiber) qui correspond à la ligno-cellulose.
 - ADL (acid detergent lignine) qui correspond à la lignine.
- La détermination des sucres est effectuée au moyen du test standard au dinitro-salicylique (DNS) [39].
- La concentration en glucose est obtenue par une technique enzymatique glucose oxydase/peroxydase [40].
- L'activité enzymatique du *T. reesei* est déterminée au moyen de la méthode développée par Mandels et Andreotti [41] qui utilise le papier filtre wattman N°1 (50mg) comme substrat standard.
- Le rendement de saccharification est déterminé en calculant le pourcentage de cellulose hydrolysée par rapport à la quantité totale disponible dans le matériau.
- La productivité instantanée (P_i) du bioréacteur continu à membrane représentant la quantité de produit obtenu par masse d'enzyme [54] est déterminée par l'équation suivante :

$$P_i = \frac{C_p t Q_p}{V C_E} \quad (1)$$

Où : C_p et C_E sont respectivement les concentrations du produit et de l'enzyme utilisés. Q_p , V et t sont respectivement le débit du perméat, le volume du réacteur et le temps expérimental.

Toutes les expériences ont été reproduites et elles ont montré des différences inférieures à 8%.

4. Résultats et Discussion

4.1 Rejet d'enzyme de la membrane

L'activité enzymatique résiduelle de *Trichoderma reesei* dans la boucle de recyclage du bioréacteur et dans le perméat a été déterminée. .

L'expérience a consisté à recycler une solution pure d'enzyme dans le bioréacteur. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 3.2.

Ils indiquent qu'en 6 heures, l'activité du *Trichoderma reesei* dans la boucle de recyclage du bioréacteur diminue approximativement de 30% pour la membrane Carbosep M5. Par contre, l'activité enzymatique dans le perméat est pratiquement négligeable (1,5%). Ces résultats indiquent que le *Trichoderma reesei* a été complètement rejeté par la membrane minérale.

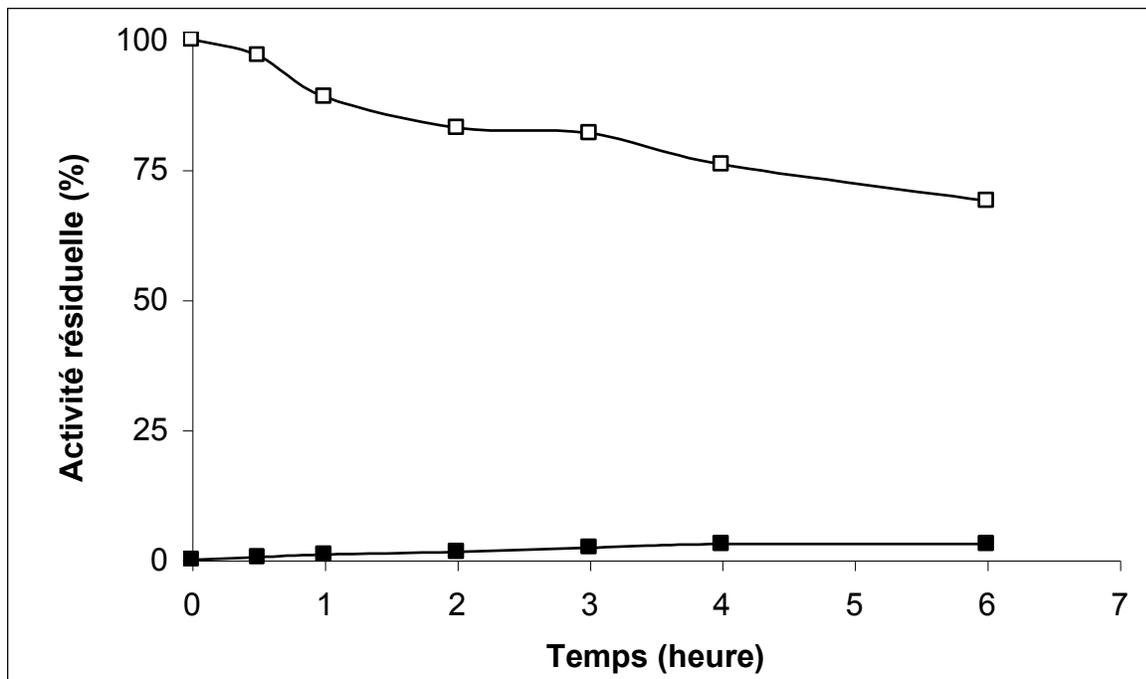


Figure 3.2 : Activité enzymatique résiduelle dans la solution concentrée et dans le perméat;

$U = 0,85\text{m/s}$, $\text{pH}=5$, $\Delta P=0,08\text{Mpa}$ et $C_E = 4\text{g/l}$.

(□) Solution concentrée ; (■) Perméat

La comparaison de ces résultats avec la baisse de l'activité enzymatique (de l'ordre de 10%) dans les conditions du batch, indiquerait qu'en mode continu la perte de l'activité enzymatique pourrait être attribuée, en grande partie, à l'adsorption ou au blocage des biocatalyseurs à la surface de la membrane ou dans les pores de la membrane [55-56-60-61].

Afin d'évaluer l'importance de l'adsorption, nous avons mesuré la perméabilité hydraulique de la membrane avant et après l'hydrolyse enzymatique du résidu solide des rejets d'huilerie dans un réacteur continu à membrane avec une eau préfiltrée (Figure 3.3).

La grande baisse de la perméabilité après filtration est estimée à 70% pour la membrane d'ultrafiltration (M5), comme calculé par le rapport des pentes (perméabilité de la membrane-solvant) obtenu avant et après filtration. Une baisse de la perméabilité du même ordre (entre 60 et 70%) est obtenue pour les divers paramètres expérimentaux : concentration en substrat, pression moyenne transmembranaire (ΔP) et la vitesse tangentielle (U). Ces résultats indiquent qu'il existerait une forte interaction entre la membrane d'ultrafiltration et la biomasse existant au sein du bioréacteur.

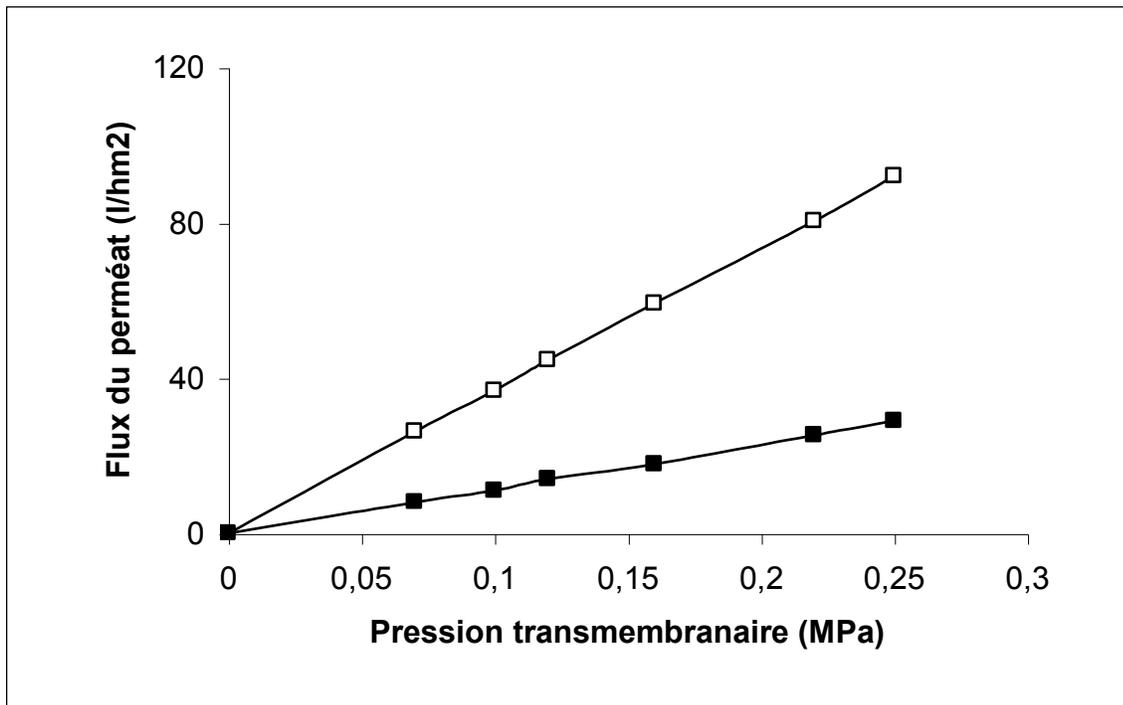


Figure 3.3: Perméabilité solvant- membrane; $U = 0,85 \text{ m/s}$, $\text{pH} = 5$ et $T = 50^\circ\text{C}$;
(□) Membrane vierge ; (■) Après ultrafiltration

Les perméabilités des membranes seront calculées en déduisant la pente des courbes linéaires obtenues en traçant la variation du flux du perméat en fonction de la pression moyenne transmembranaire pendant la filtration de l'eau préfiltrée.

4.2 Influence des paramètres hydrodynamiques sur le flux du perméat avec un recyclage total du perméat.

Nous étudions l'influence de la pression moyenne transmembranaire (ΔP) et de la vitesse tangentielle (U) sur le flux du perméat pendant l'ultrafiltration.

L'hydrolyse enzymatique est effectuée dans un bioréacteur en batch dans les conditions optimales ($T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $E/S = 0,1 \text{ g/g}$, $C_E = 4\text{g/l}$ et $t_b = 5\text{h}$) déterminés antérieurement [48].

L'hydrolysât obtenu est pompé dans le compartiment concentré, la filtration s'effectue avec une membrane minérale avec un recyclage du perméat.

Les résultats obtenus sont illustrés sur la Figure 3.4.

Ils indiqueraient pour la membrane que la polarisation de concentration se produit à toutes les vitesses tangentielles.

Les courbes obtenues montreraient que pour les faibles vitesses, le flux du perméat serait indépendant de la pression moyenne transmembranaire pour les valeurs supérieures à $2 \times 10^5 \text{ Pa}$.

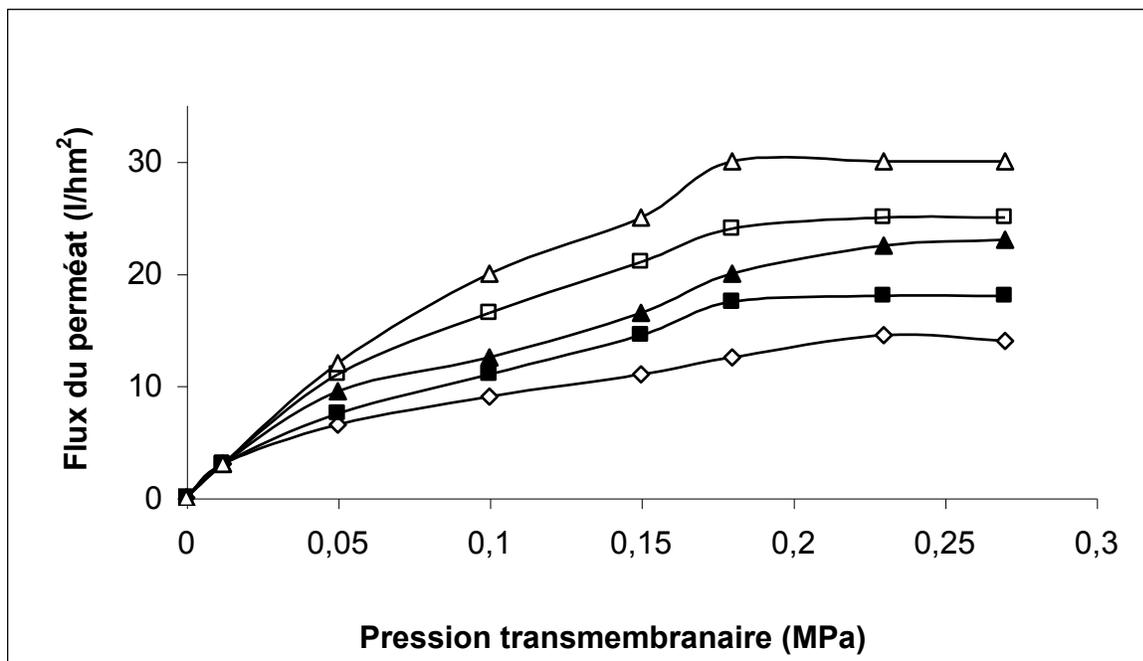


Figure 3.4: Variation du flux du perméat avec la pression transmembranaire à différentes vitesses; $\text{pH}=5$, $T= 50^\circ\text{C}$, $C_E = 4\text{g/l}$ et $E/S= 0,1\text{g/g}$; (◇) $U=0,3\text{m/s}$; (■) $U=0,6\text{m/s}$; (▲) $U=0,75\text{m/s}$; (□) $U=0,85\text{m/s}$; (△) $U=1,1\text{m/s}$

Considérant que le flux du perméat est le paramètre caractérisant la performance du processus, les meilleures conditions expérimentales sont celles pour lesquelles un plateau est atteint pour une pression appliquée avec la valeur de la vitesse tangentielle la plus élevée. Un certain nombre de paramètres expérimentaux devraient être compris dans la détermination des conditions optimales de l'ultrafiltration couplée à un bioréacteur. Il s'agirait du rendement de saccharification et de la productivité instantanée, considérés comme paramètres importants pour mesurer l'efficacité du procédé.

4.3 Influence des paramètres hydrodynamiques sur le rendement de saccharification et sur la productivité instantanée

Nous étudions l'influence de la vitesse tangentielle sur le rendement de saccharification dans un réacteur continu à membrane.

La saccharification enzymatique est réalisée en batch dans les conditions optimales pendant 5 heures [48], l'hydrolysât obtenu est pompé vers le compartiment concentré. La filtration est réalisée avec une membrane minérale avec recyclage du perméat pendant une demi-heure. Immédiatement après, l'expérience enzymatique est effectuée en mode continu avec recyclage du perméat.

Les résultats obtenus sont montrés sur la Figure 3.5a. Il apparaît qu'un accroissement du rendement de la saccharification est obtenu avec l'augmentation de la vitesse tangentielle dans une zone allant 0,3 à 1,1 m/s. Les valeurs de l'état d'équilibre sont atteintes au bout de 9 heures, indépendamment des vitesses tangentielles utilisées.

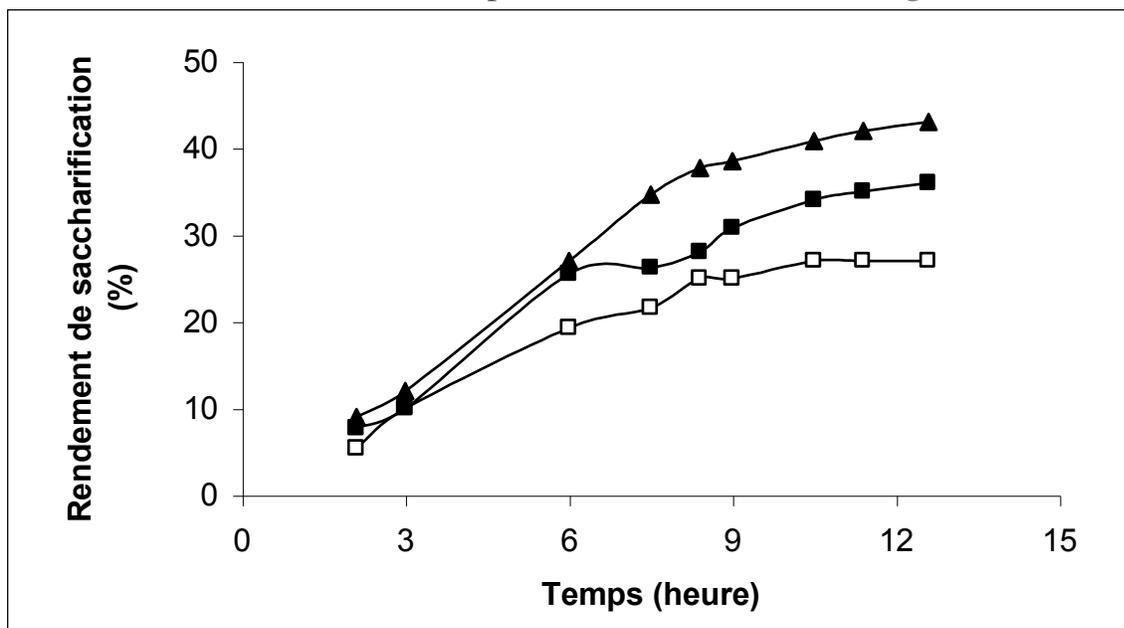


Figure 3.5a : Influence de U sur le rendement de saccharification $pH=5$, $T= 50^{\circ}C$, $\Delta P =0.08Mpa$, $C_E =4g/l$ et $E/S=0.1g/g$; (□) $U=0,3m/s$; (■) $U=0,6m/s$; (▲) $U=1,1m/s$.

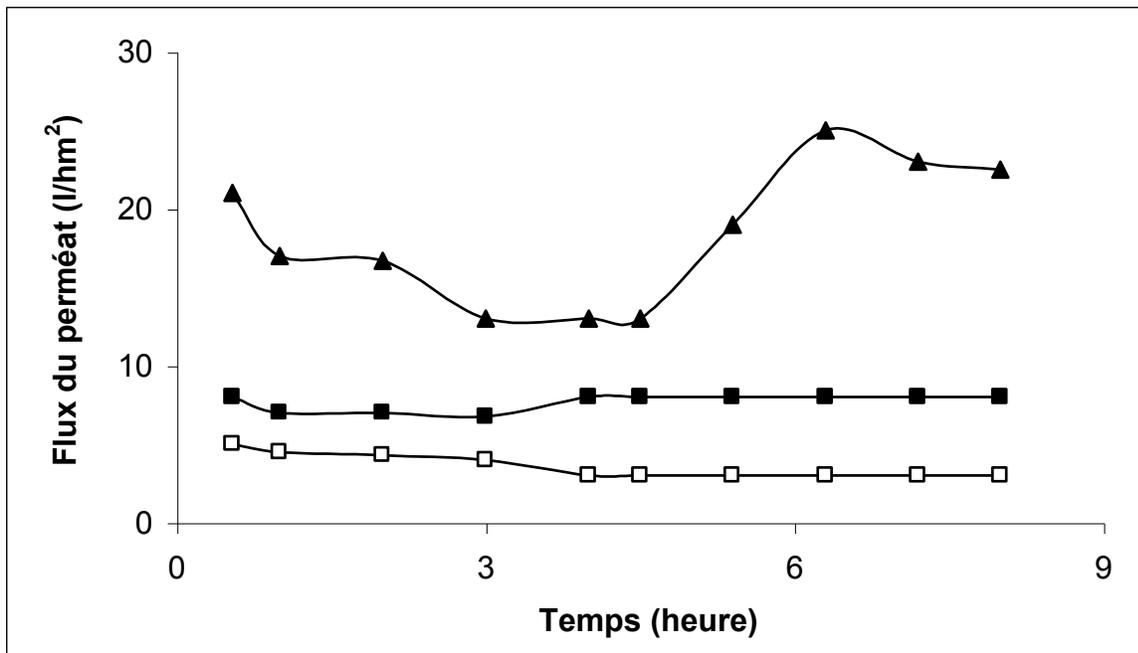


Figure 3.5b : Variation du flux du perméat durant la saccharification enzymatique à différentes vitesses; pH =5, T =50°C, $\Delta P = 0,08 \text{ Mpa}$, $C_E = 4 \text{ g/l}$ et $E/S = 0,1 \text{ g/g}$; (□) $U=0,3 \text{ m/s}$; (■) $U=0,6 \text{ m/s}$; (▲) $U=1,1 \text{ m/s}$.

La mesure du flux de perméat (J_V) durant l'expérience (Figure 3.5b) permet de déduire un rapide déclin du flux rapide pour la vitesse tangentielle la plus grande ($U=1,1 \text{ m/s}$) durant les 4,5 premières heures ; puis le flux du perméat augmente et atteint l'état d'équilibre après un temps de 6 heures.

Il apparaît également que, les flux du perméat aux vitesses tangentielles $U=0,3 \text{ m/s}$ et $U=0,6 \text{ m/s}$, sont pratiquement constant durant l'expérience.

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'aux vitesses élevées, l'effet combiné de la turbulence dynamique induit par les granules fluidisés du résidu solide (grignon solide) et l'accumulation de l'enzyme à la surface de la couche de polarisation augmente les performances de la saccharification dans un bioréacteur continu à membrane.

La réduction du rayon des particules lignocellulosiques pendant l'expérience rend ces particules plus efficaces en réduisant la résistance hydraulique de la membrane et en pénétrant la couche de polarisation où la concentration en enzyme est 100 fois plus élevée que celle de la solution [62-63].

Il est bien connu que le traitement de différents matériaux celluloseux par hydrolyse enzymatique montre un modèle d'adsorption désorption d'enzyme dans tous les matériaux [64].

Une augmentation de la concentration d'enzyme sur la membrane d'ultrafiltration induirait une augmentation de la vitesse relative d'adsorption et de saccharification. D'autres explications, basées sur une amélioration du mélange ou de la rupture mécanique des particules à une vitesse plus élevée de la pompe de recyclage, pourraient également évoquer les rendements plus élevés à vitesse U plus grande.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'étude de l'influence de U sur la productivité instantanée du processus enzymatique (Figure 3.5c) et, de là confirment que l'optimum de la vitesse tangentielle est de 1,1 m/s.

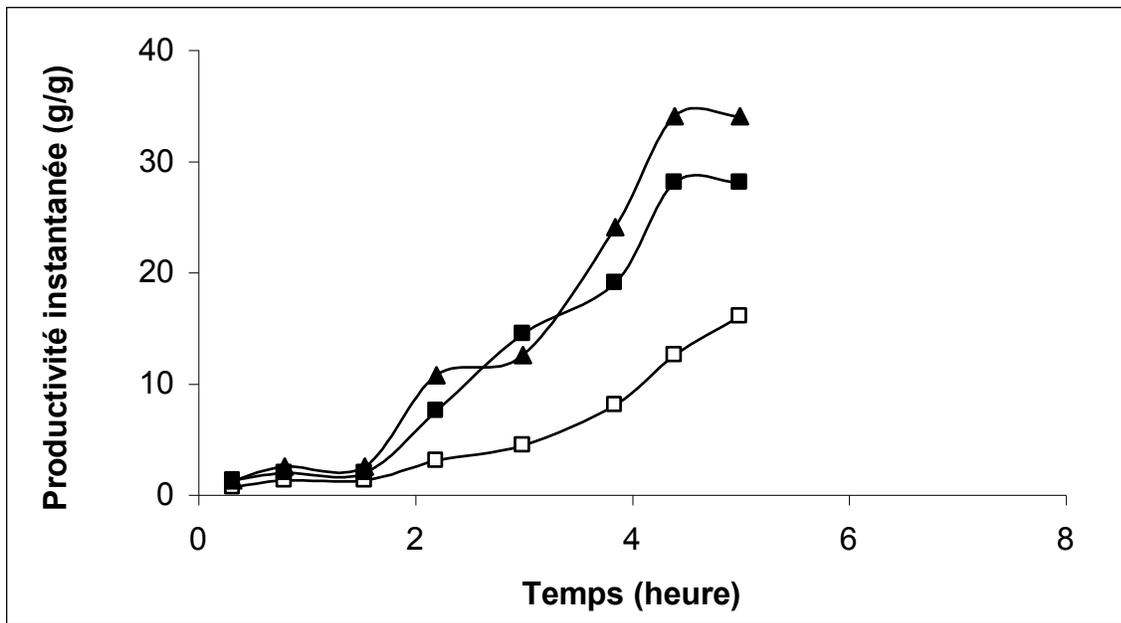


Figure 3.5c : Influence de U sur la productivité instantanée; $\text{pH}=5$, $T = 50^\circ\text{C}$, $\Delta P = 0,08 \text{ Mpa}$, $C_E = 4 \text{ g/l}$ et $E/S = 0,1 \text{ g/g}$; (\square) $U=0,3 \text{ m/s}$; (\blacksquare) $U=0,6 \text{ m/s}$; (\blacktriangle) $U=1,1 \text{ m/s}$.

Nous avons étudié l'effet de la pression transmembranaire sur le rendement de saccharification à la vitesse tangentielle de 1,1m/s (Figure 3.6a).

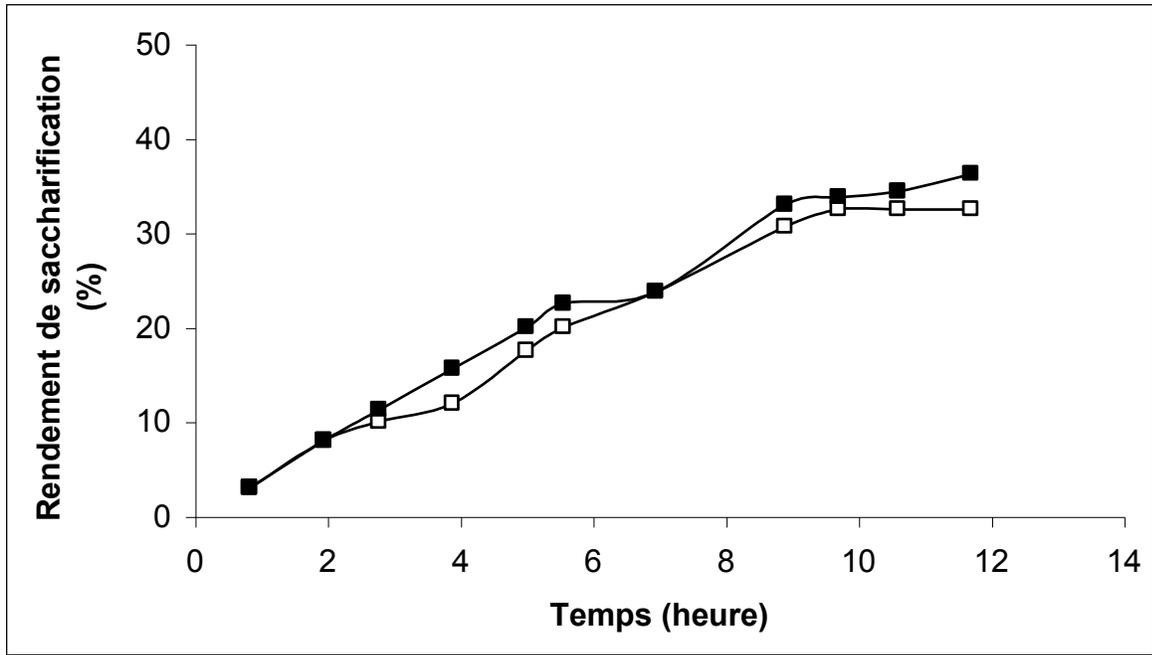


Figure 3.6a : Effet de la pression transmembranaire (ΔP) sur le rendement de saccharification; $U = 1,1 \text{ m/s}$, $\text{pH} = 5$, $T = 50^\circ \text{C}$, $C_E = 4 \text{ g/l}$ et $E/S = 0,1 \text{ g/g}$.
(□) $\Delta P = 0,08 \text{ Mpa}$; (■) $\Delta P = 0,13 \text{ Mpa}$.

Les pressions transmembranaires $\Delta P = 0,8 \times 10^5$ et $1,3 \times 10^5 \text{ Pa}$ donnent pratiquement le même rendement de saccharification.

La concentration du glucose produit durant l'expérience (Figure 3.6b) confirme que cette production est pratiquement la même pour les deux valeurs de pressions transmembranaires utilisées.

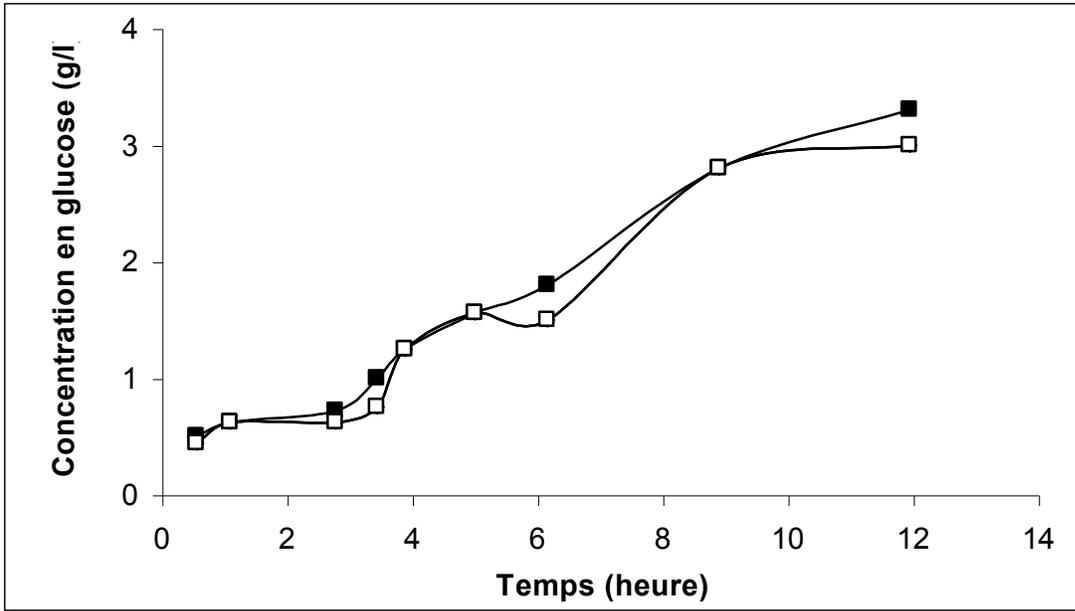


Figure 3.6b : Influence de ΔP sur la concentration en glucose produite.
 $U=1,1 \text{ m/s}$, $\text{pH}=5$, $T=50^\circ\text{C}$, $C_E=4 \text{ g/l}$ et $E/S=0,1 \text{ g/g}$; (□) $\Delta P=0,08 \text{ Mpa}$; (■) $\Delta P=0,13 \text{ Mpa}$.

La mesure du flux perméable (J_v) pendant l'expérience (figure 3.6c) permet de confirmer la baisse du flux rapide initial pour une vitesse tangentielle correspondant à $1,1 \text{ m/s}$. Le flux du perméat croît et atteint l'état d'équilibre au bout de 6 heures pour les deux valeurs de pressions transmembranaires utilisées.

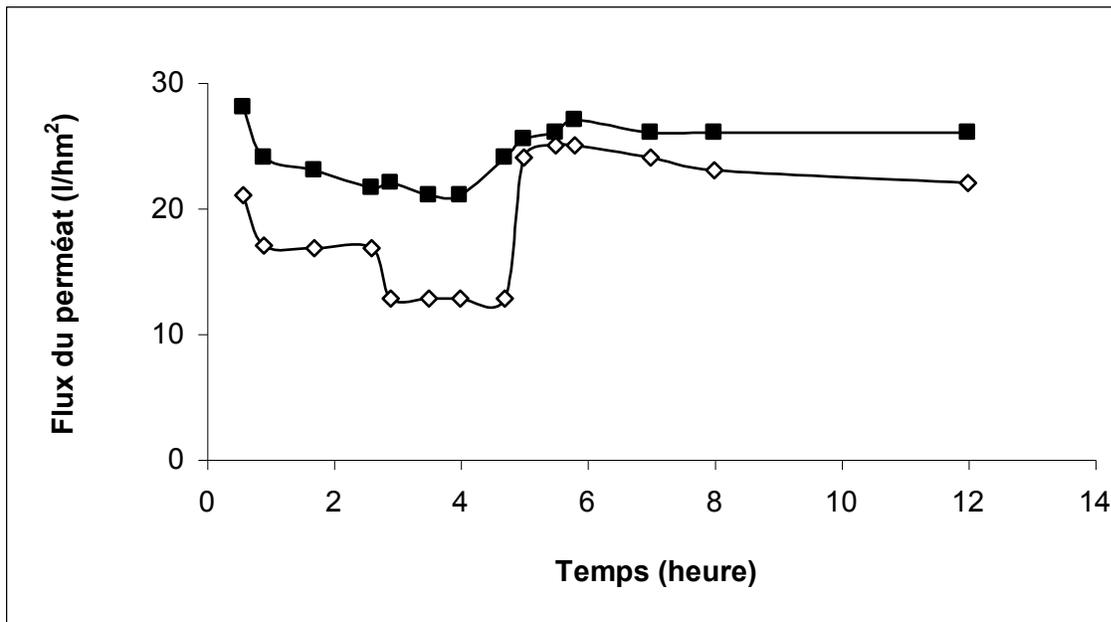


Figure 3.6c : Variation du flux du perméat pendant la saccharification enzymatique à différentes pressions; $U=1,1 \text{ m/s}$, $\text{pH}=5$, $T=50^\circ\text{C}$, $C_E=4 \text{ g/l}$ et $E/S=0,1 \text{ g/g}$; (◇) $\Delta P=0,08 \text{ Mpa}$; (■) $\Delta P=0,13 \text{ Mpa}$.

4.4 Effet du rapport de la masse d'enzyme à la masse initiale de substrat (E/S) sur la performance du bioréacteur continu à membrane

Jusqu'ici, le rapport utilisé était le rapport optimum $E/S = 0,1g/g$ déterminé en mode batch.

L'étude du paramètre E/S dans l'hydrolyse enzymatique en bioréacteur continu à membrane permet de déterminer la cinétique continue du bioréacteur en faisant varier la concentration initiale du substrat (S_0) de 25 à 100g/l.

Les données obtenues sont représentées sur la figure 3.7a.

Un état d'équilibre apparent est atteint en 8 heures pour les faibles concentrations en substrat.

En mode discontinu, l'état d'équilibre apparent est atteint au bout d'un temps plus long de 24 heures.

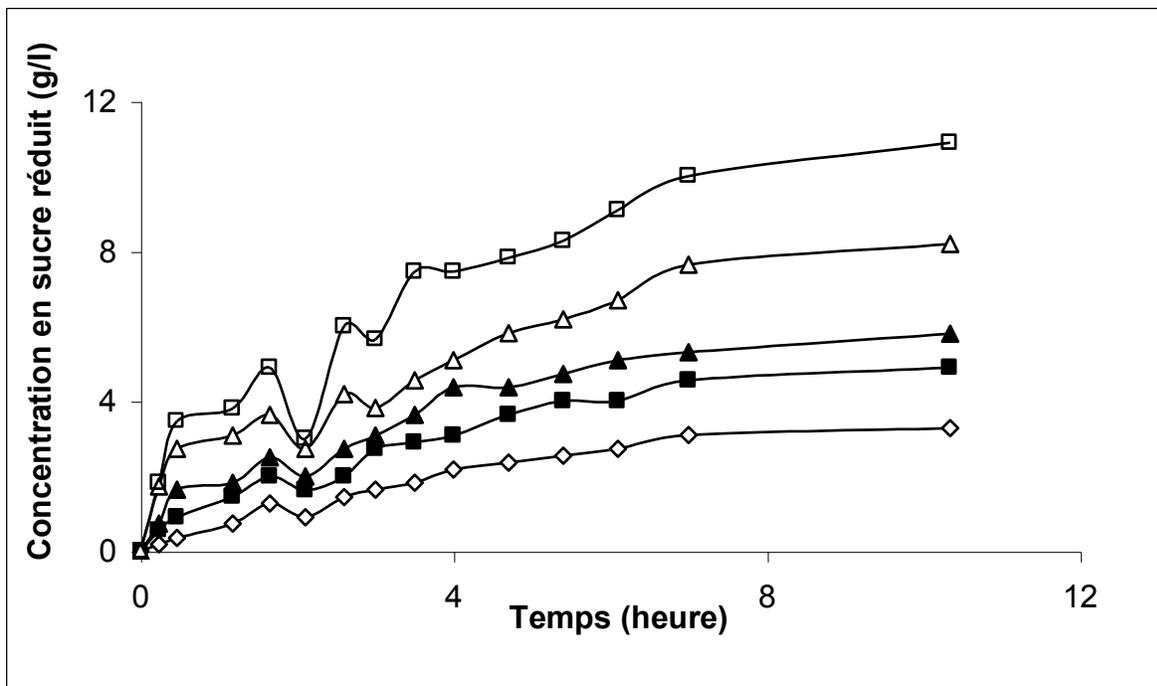


Figure 3.7a : Variation de la concentration en sucre réduit à différentes valeurs du rapport E/S; $\Delta P = 0,13Mpa$, $U = 1,1m/s$, $pH=5$, $T = 50^{\circ}C$ et $C_E = 4g/l$; (◇) $E/S=0,16g/g$; (■) $E/S=0,12g/g$; (▲) $E/S=0,08g/g$; (△) $E/S=0,06g/g$; (◻) $E/S=0,04g/g$.

La représentation double inverse de Lineweaver-Burk (Figure 3.7b) conduit aux constantes cinétiques : $K_m=217\text{g/l}$ et $V_m=0,145\text{g/l min}$.

Ces valeurs sont obtenues pour le bioréacteur continu à membrane à partir de l'expression de la vitesse de Michaelis et Menten :

$$V_0 = V_m \frac{S_0}{S_0 + K_m} \quad (2)$$

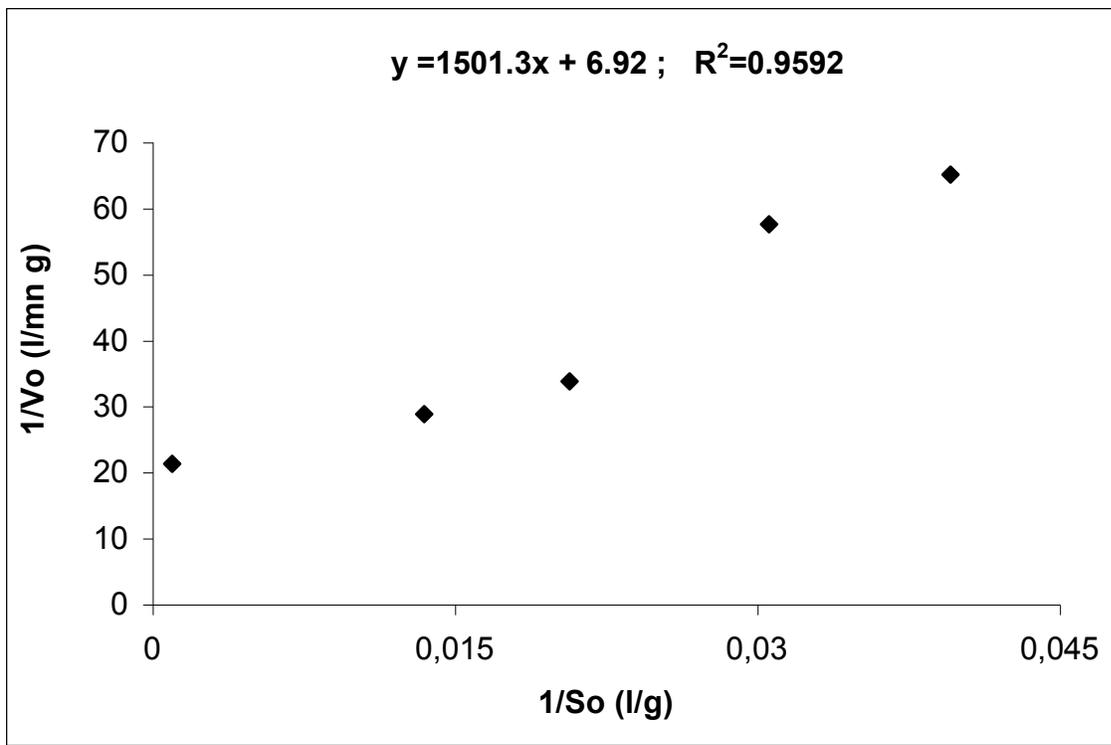


Figure 3.7b : Représentation de Lineweaver-Burk.

La valeur de K_m obtenu avec le bioréacteur continu à membrane est trois fois plus inférieure que celle déterminée en réacteur batch. Ces résultats semblent indiquer une plus grande affinité de l'enzyme de *T. reesei* à l'égard du résidu solide du grignon d'olive dans le réacteur continu à membrane qu'en système batch.

Il est également important de noter que le paramètre K_m a été déterminé pour une enzyme fonctionnant avec des conditions expérimentales différentes de celles produites au cours du traitement en système batch. En effet, dans le procédé continu,

l'effet des conditions établies sur la couche de polarisation (forte concentration de l'enzyme et possible variation de la force ionique et du pH) contribue à changer l'affinité de l'enzyme à l'égard du substrat.

Il a également été observé que les effets inhibiteurs n'existent pas dans le réacteur continu à membrane et ce, malgré la concentration en substrat de 100 mg/l (ou E/S = 0,04 g/g).

Cependant, dans un réacteur batch, les résultats obtenus obéissent à la formule de Lineweaver-Burk seulement pour les basses concentrations en substrat (c'est à dire des valeurs de $1/S_0$ élevées). Aux concentrations en substrat plus grandes que E/S=0,1 g/g (ou $S_0 = 40$ g/l), il y a effet d'inhibition.

5. Conclusion

L'hydrolyse enzymatique du résidu solide des rejets d'huilerie dans un bioréacteur continu à membrane a permis d'obtenir un rendement de saccharification de 45% après un temps expérimental de 14 heures tandis que, le réacteur fonctionnant en batch requiert 24 heures.

Il semblerait que l'enzyme de *Trichoderma reesei* possède une plus grande affinité pour le substrat du résidu solide de grignon d'olive dans le réacteur continu à membrane qu'en système batch.

De même, l'effet d'inhibition ne se produit pas dans le réacteur continu à membrane avec des concentrations en substrat 2,5 fois plus grandes que la concentration limite obtenue en système batch.

Enfin, la cinétique de la réaction est de type Michaelienne.

Références bibliographiques.

- [1] C. Balis, J. Chatzipavlidis, F. Flouri, Olive Mill Waste as a substrate for nitrogen fixation, *Int. Biodeterior.* 1996, 38 (3-4) 169-178
- [2] M.J. Lopez, A. Ramos-Cormenzana, Xanthan production from olive-mill wastewaters, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 1996, 38 (3-4) 263-270.
- [3] S.S. Villasclaras, M.E.M. Sancho, M.E.T. Caballero, A.D. Perez, Production of microalgae from olive mill wastewater, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 1996, 38 (3-4) 245-247.
- [4] J. Karam, J.A. Nicell, Potential applications of enzymes in waste treatment, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1997, 69, 141-153.
- [5] P. Alvo, K. Belkacemi, Enzymatic saccharification of milled timothy (*phleum pratense* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Bioressour. Technol.* 1997, 61 (3) 185-198.
- [6] M. Spagnuolo, C. Crecchio, M.D.R. Pizzigallo, P. Ruggiero, Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp, *Bioressour. Technol.* 1997, 60 (3) 215-222.
- [7] K.K. Kim., K.K. Jun-Suk, K.K. Oh, S.W. Kim, Y.S. Jeong, S.I. Hong, Ethanol production from lignocellulosic biomass by simultaneous saccharification and fermentation employing the reuse of yeast and enzyme, *J. Microb. Biotechnol.* 1999, 9 (3) 297-302.
- [8] P.V. Lyer, Y.Y. Lee, Simultaneous saccharification and extractive fermentation of lignocellulosic materials into lactic acid in a two-zone fermentor-extractor, *Appl. Biochem.* 1999, 77-79, 409-419.
- [9] S. Oi, K.M. Matsuzaki, T. Tanaka, M. Iizuka, M. Taniguchi, P. Prasertan, Effect of steam explosion treatment on enzymatic hydrolysis of the palm cake and fibre as solid wastes and natural resources, *J. Ferm. Bioe.* 1994, 77 (3) 326-328.
- [10] B.K. Behera, M. Arora, D.K. Sharma, Scanning electron microscopic (SEM) studies on structural architecture of lignocellulosic materials of *calotropis procera* during its processing for saccharification, *Bioressour. Technol.* 1996, 58 (3) 241-245.
- [11] J.M. Martinez, J. Reguant, M.A. Montero, D. Montane, J. Salvado, X. Hydrolytic pre-treatment of softwood, *Ind. Eng. Chem. Res.* 1997, 36 (3) 688-696.
- [12] P. Savoie, D. de Halleux, K. Belkacemi, G. Turcotte, P. Nadeau, J. Chiquette, Enzymatic hydrolysis of forage and straw pretreated with ammonia, *Can. Agric. Eng.* 1998, 40 (3) 207-212.
- [13] L.C. Teixeira, J.C. Linden, H.A. Schroeder, Optimizing peracetic acid pre-treatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel, in: *Proceedings of the 1998 World Renewable Energy Congress*, 20-25 September 1998, Florence, Italy, 1070-1073.

- [14] R. François. Les industries des corps gras. Ed tech et doc, Genève (1974).
- [15] A. Nefzaoui. Valorisation des résidus lignocellulosiques dans l'alimentation des ruminants par les traitements aux alcalis. Thèse d'état, Université catholique de Louvain-La-Neuve. Belgique (1985).
- [16] J. Pourquie, J.Vandecastelle. Conversion des composés lignocellulosiques par hydrolyse enzymatique. Dans Biotechnologie, Scriban. Ed tech et Doc, Lavoisier, Paris (1993).
- [17] A. Mouranche, C. Costes. Hydrolases et dépolymérasés. Ed Gauthier-Villard, Paris (1985).
- [18] S. Pilet. Les parois cellulaires: Structure et fonctions cellulaires. Ed Masson (1971).
- [19] A. L. Lehninger, (1977). Biochimie. 2^{ème} Ed, Flammarion, Paris.
- [20] B. Monties. Les polymères pariétaux et alimentaires non azotées. Ed Gauthier-Villard (1980).
- [21] R. W. William, E. Henry. Hemicellulose digestibilité by steers fed cured hay and drum-dehydrated Alfafa and Coastal Bermuda grass. J. Agric. Food. Chem, 1987, 35, 698-704..
- [22] K. T. Kent, T. Hyguchi, H. M. Chang, (1981). Lignin biodegradation. Microbiology chemistry and potential application, volume1, 2^{ème} Ed Boca Raton, Floride.
- [23] B. L. Sun, J. A. Kid. Structural properties of cellulose and cellulase mechanisms. Biotech and Bioeng, 1983, 25, 33-35.
- [24] M. Gharpuray, L. Young Huyin, L. T. Fan. Structural modifications of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. Biotech. And Bioeng, 1983, 25, 157-172.
- [25] P. P. Vinod. Effect of cristallinity and degree of polymerisation of cellulose enzymatic saccharification. Biotech. And Bioeng, 1984, 26, 1219-1222.
- [26] Young Huyun. Kinetics studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose II. Biotech and Bioeng, 1983, 25, 939-966.
- [27] B. L. Sun, D. Y. Demay. Assorption of cellulase on cellulose: Effect of physicochemical properties of cellulase on adsorption and rate of hydrolysis. Biotech. And bioeng., 1982, 24, 2137-2153.
- [28] L. Vallander, K. E. Erickson, (1994). Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of art. Advances in biochemical engineering/Biotechnology, 1994, 42, 63-95.
- [29] L. T. Fan, L. Young Huyun. The nature of lignocellulosics and their pre-treatment for enzymatic hydrolysis. Advances in Biochemical engineering Biotechnology, 1994, 42, 156-182.
- [30] S. Sumudi, K. Matsuzaki. Effect of steam explosion treatment on enzymatic hydrolysis of palm cake and fiber as solid wastes and natural ressources. Journal of fermentation and bioengineering, 1994, 77, 3, 326-328.

- [31] G. Augerinos, D. Wang. Selective solvent delignification of fermentation enhancement. *Biotech. And bioeng.*, 1988, 25, 67-83.
- [32] I.M. Morrison. Influence of chemical and biological pre-treatment on the degradation of lignocellulosic material by biological systems. *Journal of science food agriculture*, 1988, 42, 295-304.
- [33] M. Javillier, M. Polonovski. *Traité de biochimie. Tome 2. Ed. Masson, Paris, 1964.*
- [34] J. Szcodrak, M. C. Sklodowska. Production of cellulases and xylanases by *Trichoderma reesei* on pretreated wheat straw. *Acta biotechnology*, 1988, 8, 509-515.
- [35] P. Ducroo. Utilisation industrielle des enzymes. *Ind. Aliment. Agric.*, 1982, 39, 401-416.
- [36] G. B. Doran, C. Aldrich. Saccharification and fermentation of sugar cane bagasse by *Klebsiella oxytoca* P2. *Biotech. And bioeng.*, 1994, 4, 240-247.
- [37] J.C. Collin, R. Delecourt. *Actualités des industries alimentaires et agro-alimentaires*, 1988, 452-459.
- [38] M.B. Hall, B.A. Lewis, P.J. Van-Soest, L.E. Chase. Simple method for estimation of neutral detergent soluble fibre. *J.Sci. Food Agri.* 1997, 4, 441-449.
- [39] L.G. Miller. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 1959, 31 (3) 426-428.
- [40] Ollis, J. Bailey. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Edition, Mc.Graw-Hill, New York, 1986.
- [41] M. Mandels, R. Andreotti. Measurement of saccharification cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, Symp. 1976, 6, 21-33.
- [42] F. Boussaid. *Etude de la dénitrification in situ à l'aide des substrats cellulosiques. Thèse de Doctorat de l'université de Rennes 1, France, 1987.*
- [43] M. Linko. An evaluation of enzymatic hydrolysis of cellulosic materials, in: Ghose (Ed) . *Advances in Biochemical Engineering*, Springer, Berlin, Germany, 1977, 25-48.
- [44] M. Vanbelle, G. Bergting. Screening of fungal cellulolytic preparation for application in eniling process, in: M.P. Goughlan (Ed.), *Enzyme System for Lignocellulose Degradation*, European Community, 1989, 357-369.
- [45] O. Gaouar, C. Aymard, N. Zakhia, G.M. Rios. Enzymatic hydrolysis of Cassava starch into maltose syrup in continuous membrane reactor. *J. Chem. Technol.* 1997, 69, 367-375.
- [46] S.E. Charm. B.L. Wong. Shear effects on enzymes. *Enzym Microb. Technol.* 1983, 3, 1112-1120.
- [47] D. Belhocine, H. Mokrane, H. Grib, H. Lounici, A. Pauss, N. Mameri. Optimization of enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a continuous membrane bioreactor. *Chem. Eng. J.* 2000, 76, 189-196.

- [48] N. Abdi, F. Halet, D. Belhocine, H. Lounici, H. Grib, D.L. Piron, N. Mameri, Enzymatic treatment of solid residue of olive mill in a batch reactor, *Biochem. Eng. J.* 2000, 6, 177-183.
- [49] H. Thomas, C.F. Tanissar, L. Spano, Technology advances for continuous compression milling pre-treatment of lignocellulosics for enzymatic hydrolysis, *Biotech, Bioeng.* 1982, 24, 1495-1505.
- [50] D.J. Fox, P.P. Gray, Alkalis and steam pre-treatments of lignocellulosic materials, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1989, 44, 135-146.
- [51] D.B. Rivers, G.H. Emert, Factors affecting the enzymatic hydrolysis of municipal solid waste components, *Biotech.* 1988, 31, 278-281.
- [52] S.G. Dessai, A.O. Converse, Substrate reactivity as a function of the extent of reaction enzymatic hydrolysis in lignocellulose, *Biotech. Bioeng.* 1997, 56 (20) 650-655.
- [53] M. Cheryan, M.A. Mehaia, Membrane bioreactors, in: W.C. Mc Grego (Ed), *Membrane separations in Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, and 1986, 255-301.
- [54] A. Mannheim, M. Cheryan, Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *J. Food Sci.* 1990, 55 (2) 381.
- [55] O. Gaouar, C. Aymard, N. Zakkhia, G.M. Rios, Enzymatic hydrolysis of Cassava starch into maltose syrup in continuous membrane reactor, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1997, 69, 367.
- [56] D. Belhocine, H. Mokrane, H. Grib, A. Pauss, N. Mameri. Membrane fouling during recovery of papain enzyme, *Chem. Eng. J.* 2000, 76 (3) 189.
- [57] R.G. Henley, R.Y.K. Yang, P.F. Greenfield, Enzymatic saccharification of cellulose in membrane reactors, *Enzym. Microbiol. Technol.* 1980, 2 (3) 206.
- [58] F. Alfani, D. Albanesi, M. Cantarella, V. Scardi, A. Vetromile, Kinetics of enzymatic saccharification of cellulose in a flat-membrane reactor, *Biomass.* 1982, 2 (4) 245.
- [59] R. Lopez-Ulibarri, G. M. Hall, Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor, *Enzyme Microb. Technol.* 1997, 21 (6) 398.
- [60] W. R. Bowen, N.J. Hall, Properties of microfiltration membranes; mechanisms of flux loss in the recovery of an enzyme, *Biotechnol. Bioeng.* 1995, 46, 28.
- [61] S. E. Charm, B. L. Wong, Shear effects on enzyme, *Enzyme Microb. Technol.* 1983, 3, 1112.
- [62] S. Oussedik, D. Belhocine, H. Grib, H. Lounici, D.L. Piron, N. Mameri, Enhanced ultrafiltration of bovine serum albumin with pulsed electric field fluidized activated alumina, *Desalination.* 2000, 127, 59.

[63] B. Bariou, S. Poyen, N. Mameri, Y. Jarny, Ultrafiltration in an unstirred macromolecule at rejection of $R = 1$ in the absence of a gel, *Int. Chem. Eng.*, 1990, 30 (4) 672.

[64] J.P.H. Van Wyk, Cellulase adsorption-desorption and cellulose saccharification during enzymatic hydrolysis of cellulose materials, *Biotechnol. Lett.* 1997, 19 (8) 775.

PARTIE 2 VOLET 3

AMELIORATION DES PERFORMANCES DE LA SACCHARIFICATION ENZYMATIQUE DU GRIGNON D'OLIVE PAR UTILISATION D'UN CHAMP ELECTRIQUE

1. Introduction

Le grignon d'olive est un rejet solide pénalisant le monde de l'agriculture par l'effet inhibiteur qu'il produit (polyphénols). Le traitement par voie physico-chimique ou biologique [1-4] donne des résultats satisfaisants mais toutefois, toute nouvelle technologie qui pourrait améliorer ces derniers, rendrait plus attractif ces procédés de traitement. Dans ce but, nous nous sommes intéressés à l'application d'un champ électrique en vue d'améliorer les performances de saccharification du grignon d'olive. L'utilisation d'un champ électrique en vue d'améliorer les performances d'un procédé a été réalisée dans différentes techniques : ultrafiltration, électrosorption [3-4-5]. De même, le champ électrique a été utilisé pour accroître les capacités de rendement de l'extraction d'huile et de jus de fruit [5]. A notre connaissance, l'utilisation d'un champ électrique pour améliorer les performances d'un réacteur enzymatique n'a pas fait l'objet de travaux scientifiques ; nos travaux seront menés en adoptant les conditions optimales déterminées en mode batch [9], c'est à dire pH5, T= 50° C et E/S= 0,1g d'enzymes /g de grignon. La présente étude se rapporte à l'influence du champ électrique sur le rendement de saccharification.

2. Matériels et méthodes

2.1 Bioréacteur

Le Bioréacteur discontinu est illustré sur la figure 4.1.

L'application du champ électrique a été réalisée en intégrant deux électrodes à l'intérieur du réacteur enzymatique batch..

L'application du potentiel par le biais d'un générateur (Intentiostât) induira un champ électrique entre les deux électrodes et le milieu réactionnel.

L'enzyme de *Trichoderma reesei* et le substrat (grignon d'olive) seront soumis à un champ électrique $E=U/d$ avec U : potentiel électrique ; d : distance entre les électrodes.

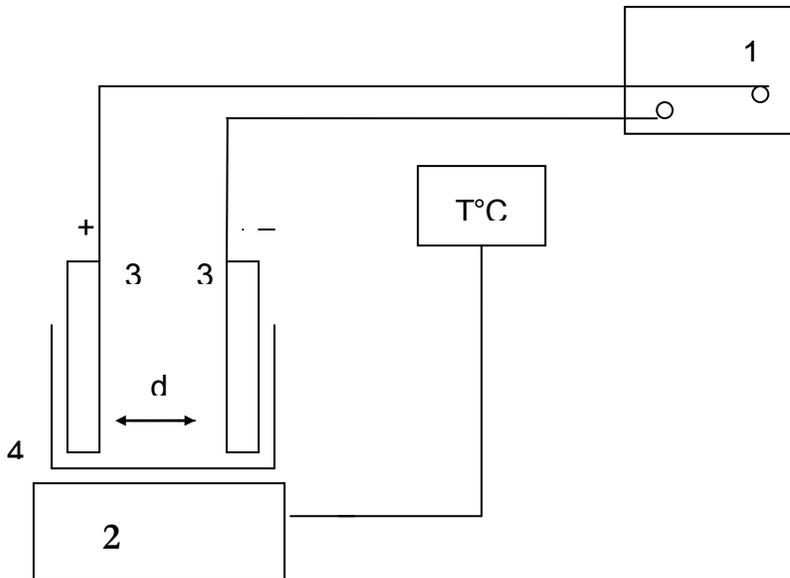


Figure 4.1 : (1) générateur ; (2) bain marie thermostaté ; (3) électrodes en inox ; (4) bioréacteur

L'application du champ électrique créé par une tension continue provoque un flux de migration des particules chargées de la suspension (enzyme + substrat). Les particules se concentrent au voisinage de l'électrode de signe opposée à leur charge.

Si l'enzyme chargée dans le milieu aqueux se trouve soumise à un champ électrique, elle se déplacera à une vitesse de migration sous l'effet de ce dernier conformément à la relation suivante :

$$J_{rp} = U_{em} \cdot E$$

J_{rp} : vitesse de migration

E : champ électrique

U_{em} : mobilité électrophorétique

De ce fait l'enzyme pourrait accéder à des sites dans le matériau poreux (le grignon

d'olive) qui lui étaient inaccessibles sans l'utilisation du champ électrique. Le champ électrique étant constant entre les deux plaques

2.2 Enzyme et substrat

Une enzyme commerciale du *Trichoderma reesei* (sigma France) vendue sous forme de poudre lyophilisée est utilisée au cours de nos essais. Elle présente une activité de 10,2 unités/mg (1 unité libère 1 μ mole de glucose à partir de cellulose en 1 heure à pH5 et T= 37° C et temps d'incubation= 2 heures).

Les solutions d'enzymes sont préparées dans une solution tampon acide acétique/acétate (0,05M à pH5)

Le substrat est un résidu solide (grignon d'olive) prélevé directement au moulin de l'huilerie. Il provient de la région de TADMAIT (Kabylie) de la campagne oléicole de 1995 à 1998. Son transport au laboratoire est effectué à 4° C.

Le résidu solide est concassé et, réduit à une granulométrie d'environ 460 μ m et ensuite séché à 70° C.

Les principales caractéristiques du matériau lignocellulosique sont données dans le tableau 4.1

Tableau 4.1 : Composition chimique du résidu solide avant et après traitement à NaOH ^(a)

Paramètres	Résidu brut %	Résidu traité %
Matières sèches	89,11	84,22
Cendres totales	04,78	10,28
Matières grasses	11,73	08,94
Azote total	07,32	06,67
Cellulose brute	46,24	42,53
Hémicellulose	23,83	00,17
Lignine	19,89	00,151
Potassium	00,098	10,25
Sodium	00,19	13,07

(a) : les concentrations sont exprimées en % de matière sèche

2.3 Méthodes analytiques

- La cellulose brute correspond au résidu organique insoluble obtenu après attaque acide (H_2SO_4 0,26N) et alcaline (NaOH 0,313N) est analysée conformément à la norme ISO-AFNOR (NFV0340, 1977).
- La teneur en composés pariétaux (cellulose, hémicellulose et lignine) est déterminée en divisant le matériau en trois fractions :
 - NDF (neutral detergent fiber) qui constitue l'essentiel de la paroi végétal.
 - ADF (acid detergent fiber) qui correspond à la lignocellulose.
 - ADL (acid detergent lignine) qui correspond à la lignine.
- L'analyse des sucres est réalisée en utilisant le test standard au dinitrosalicylique (DNS) [10]. Cette méthode est basée sur la formation du chromophore entre le produit de DNS et les groupes de molécules de sucres réduits.
- Le rendement de saccharification est déterminé en calculant le pourcentage de sucres produits par gramme de matériau.

3. Résultats et interprétation

3.1 Faisabilité du couplage Bioréacteur/champ électrique

Dans une première étape nous avons voulu tester la faisabilité de ce procédé en opérant à un potentiel choisi de l'ordre de 90mv. Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 4.2a.

Pour pouvoir évaluer l'influence du champ électrique sur la performance du réacteur enzymatique, nous avons déterminé l'évolution des sucres réducteurs dans les trois cas suivants :

- Hydrolyse enzymatique avec un grignon prétraité sans potentiel électrique.
- Hydrolyse enzymatique avec un grignon prétraité avec potentiel électrique de 90mv volts.
- Hydrolyse enzymatique avec un grignon non prétraité avec un potentiel électrique de 90mv.

Dans ce dernier cas, nous avons voulu tester la possibilité d'éviter le prétraitement par l'application d'un champ électrique. Nous remarquons d'après les résultats que les performances obtenues avec le grignon d'olive prétraité sans potentiel électrique sont similaires à ceux obtenus sans prétraitement pendant les cinq premières heures ; les résultats sans et avec prétraitement sont pratiquement similaires. Au delà, nous constatons que le grignon d'olive prétraité par NaOH permet d'obtenir une quantité plus importante en sucres réducteurs. Par contre, l'application d'un potentiel électrique sur un grignon d'olive prétraité chimiquement, permet de constater une nette amélioration du procédé prétraité et cela, dès les premières heures. En effet, nous constatons que la cinétique est plus rapide sous l'effet du champ électrique. Les résultats obtenus avec l'application du champ au bout de 6 heures ne seront atteints qu'au bout de 10 heures sans champ électrique. Ce résultat satisfaisant nous permet d'envisager l'optimisation de l'influence du champ électrique sur la saccharification du grignon d'olive

L'évolution de la quantité de sucres totaux produits est illustrée sur la figure 4.2a

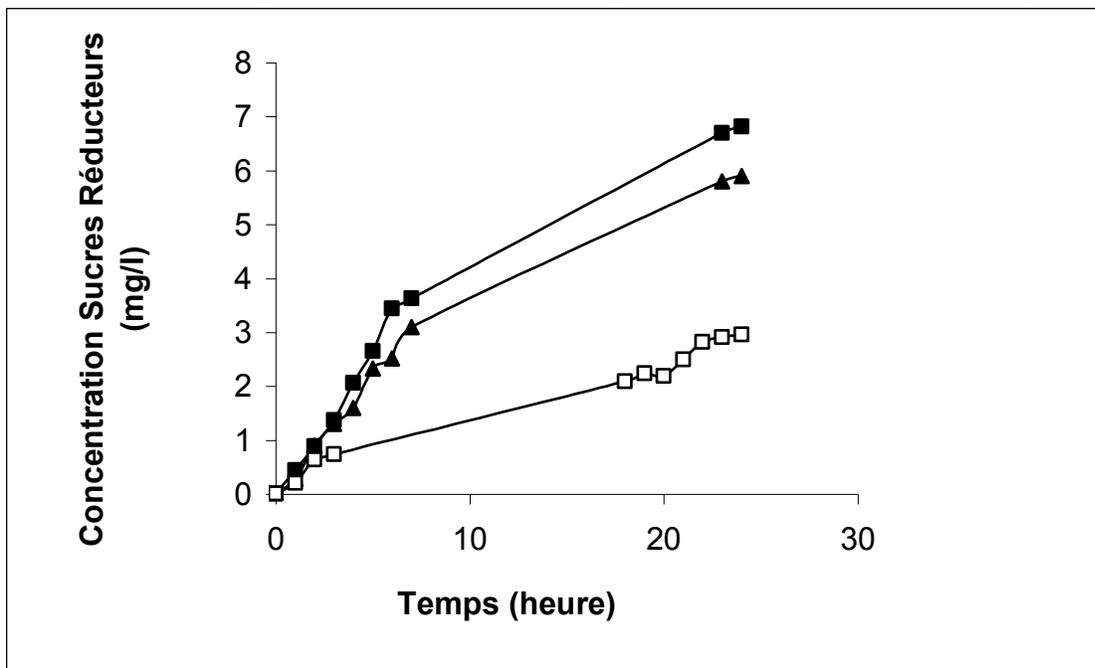


Figure 4.2a : Influence du champ électrique sur l'hydrolyse du grignon d'olive par *Trichoderma reesei*. (▲) 0mv ; (■) 90mvs ; (□) 90mv sans NaOH

Cet effet positif du fait de l'application du champ électrique serait dû à la réduction de la résistance au transfert des molécules enzymatiques de la phase liquide vers la surface de cellulose et, par l'augmentation de l'accessibilité et de la probabilité de contact entre le substrat et l'enzyme qui favorise la formation du complexe enzyme-substrat par adsorption des molécules de l'enzyme sur les particules cellulosiques. Enfin, la charge électrique ne compense pas le prétraitement ; il serait donc préférable de prétraiter le résidu solide aux conditions optimales précédemment déterminées [9] et, de le soumettre à un champ électrique.

Le rendement d'hydrolyse est assez élevé si on se réfère aux courbes de la figure 4.2b

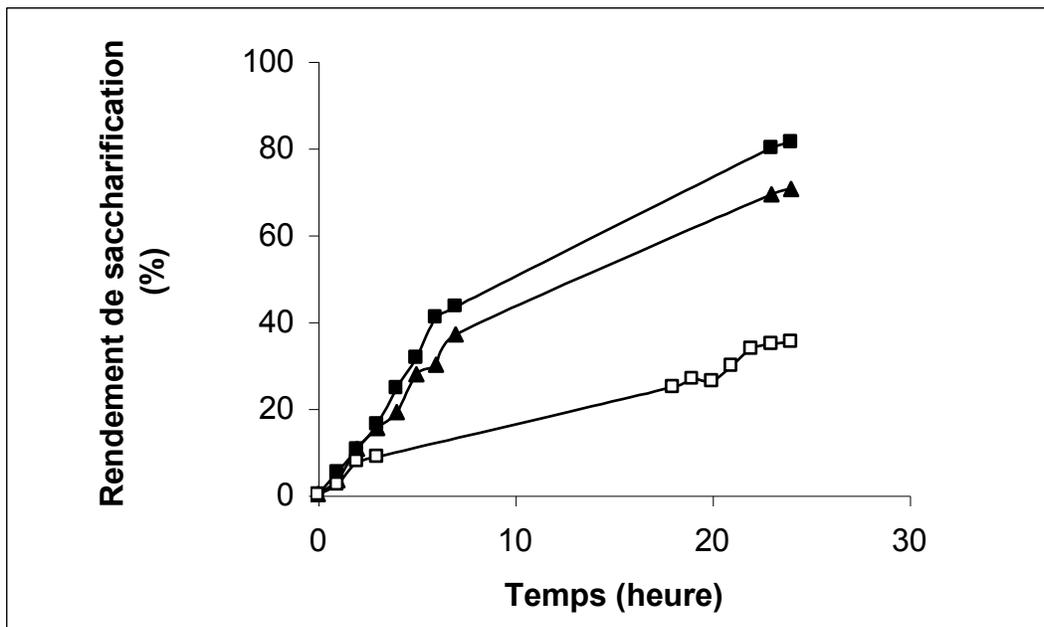


Figure 4.2b : Rendement de saccharification ; (▲) 0mv ; (■) 90mv ; (□) 90mv sans NaOH

3.2 Optimisation de l'influence du champ électrique sur la saccharification du grignon d'olive

Nous étudions l'influence du champ électrique sur la saccharification enzymatique du grignon d'olive réalisée dans les conditions optimales précédemment déterminées [9]. La réaction en batch est couplée à un champ électrique qui varie de 10 à 200mv. Il est important que le champ électrique soit optimisé car l'application de celui-ci pourrait produire une moindre action ou être fatale à l'enzyme.

L'hydrolyse enzymatique est réalisée dans un réacteur en batch aux conditions optimales : $E/S = 0,1$; $C_E=4g/l$; activité cellulolytique = 10,2 unités/mg ; pH5 et $T=50^\circ C$.

L'évolution de la concentration des sucres réducteurs produits en fonction du temps est illustrée sur la figure 4.3a

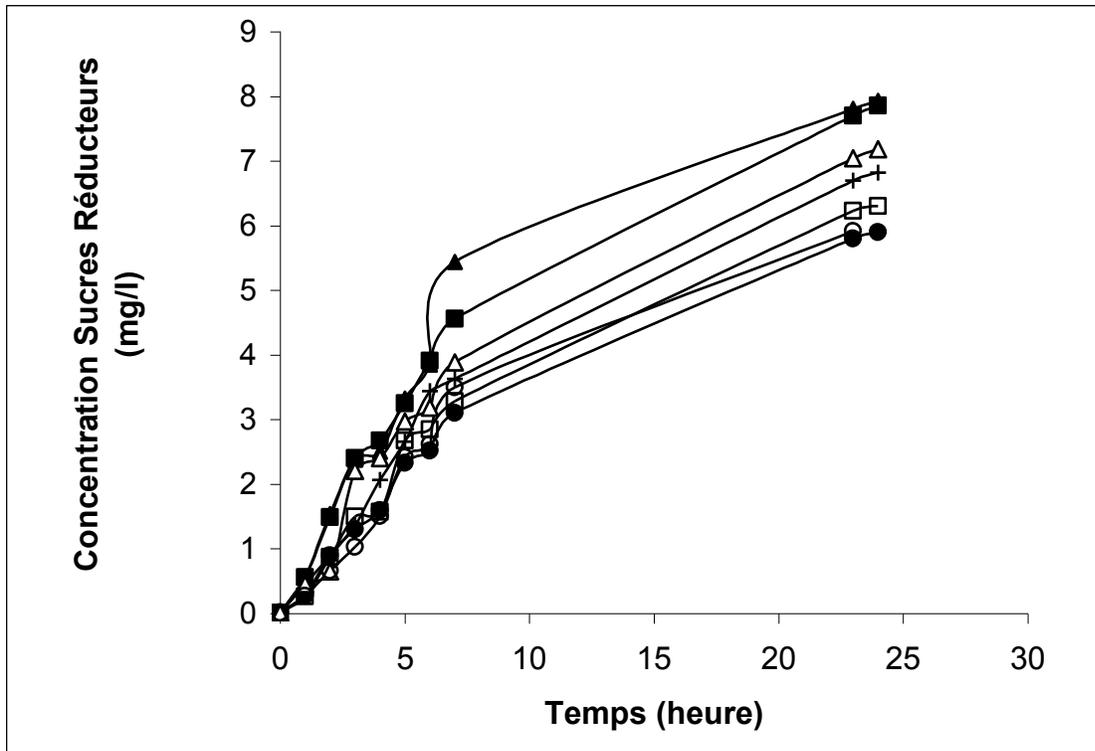


Figure 4.3a : Influence du champ électrique sur la saccharification du grignon d'olive.
(▲) 50mv ; (■) 40mv ; (+) 90mv ; (□) 150mv ; (○) 200mv ; (●) 0mv

D'après les résultats, il apparaît qu'un potentiel de 50mv correspond à la valeur optimale du potentiel électrique. L'enzyme en subissant un potentiel plus élevé pourrait se colmater sur les électrodes. Une valeur plus faible serait négligeable sur l'activité de l'enzyme

Nous confirmons ce résultat par le calcul du rendement d'hydrolyse illustré sur la figure 4.3b.

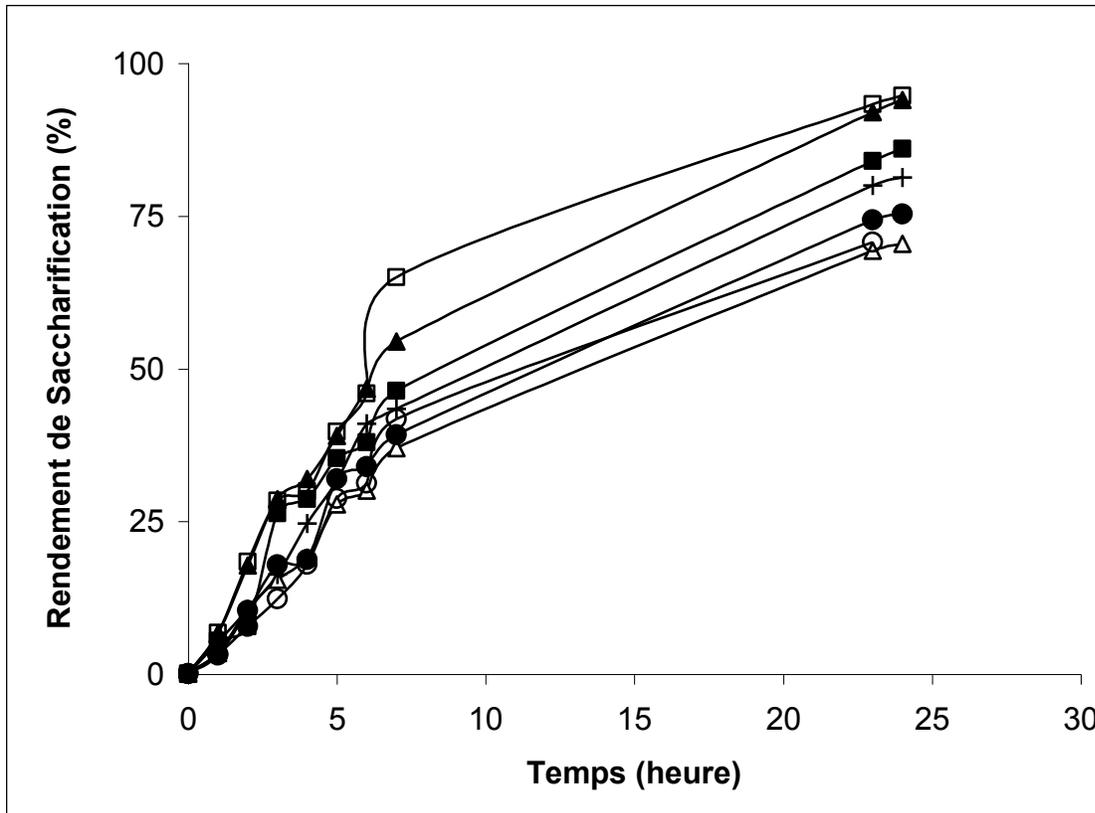


Figure 4.3b : Influence du champ électrique sur le rendement de saccharification.
 (Δ) 0mv ; (■) 30mv ; (▲) 40mv; (□) 50mv; (+) 90mv ; (●) 150mv ; (○) 200mv

En effet, nous constatons que l'application du champ électrique optimal permet une amélioration du rendement de saccharification de 35% par rapport à une hydrolyse sans champ électrique. Il est clair que les résultats obtenus à l'optimum ne pourraient pas être justifié par une cinétique plus rapide qu'on pourrait atteindre au bout de quelques heures. L'écart entre ces deux rendements de saccharification est relativement très important permettant de déduire l'efficacité du champ électrique afin d'améliorer les performances d'un réacteur enzymatique.

Nous reprenons les valeurs de rendements maximales et les taux d'amélioration obtenus pour chaque potentiel sur les figures 4.3c et 4.3d

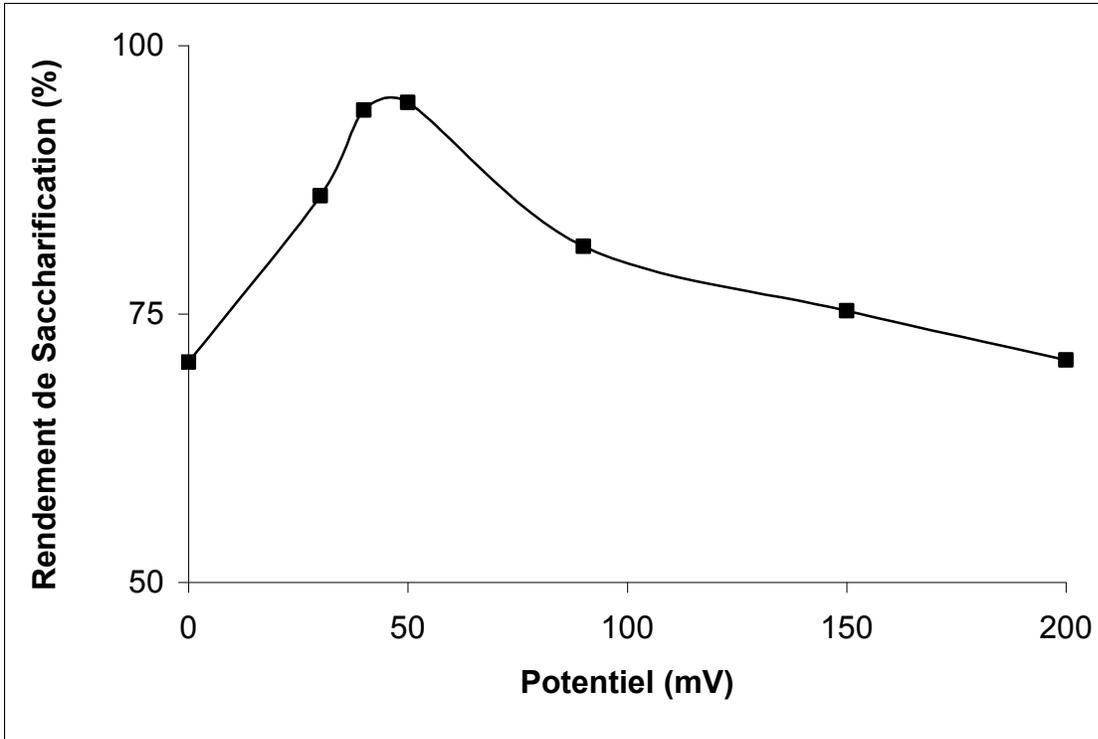


Figure 4.3c : Evolution du rendement de saccharification en fonction du potentiel.

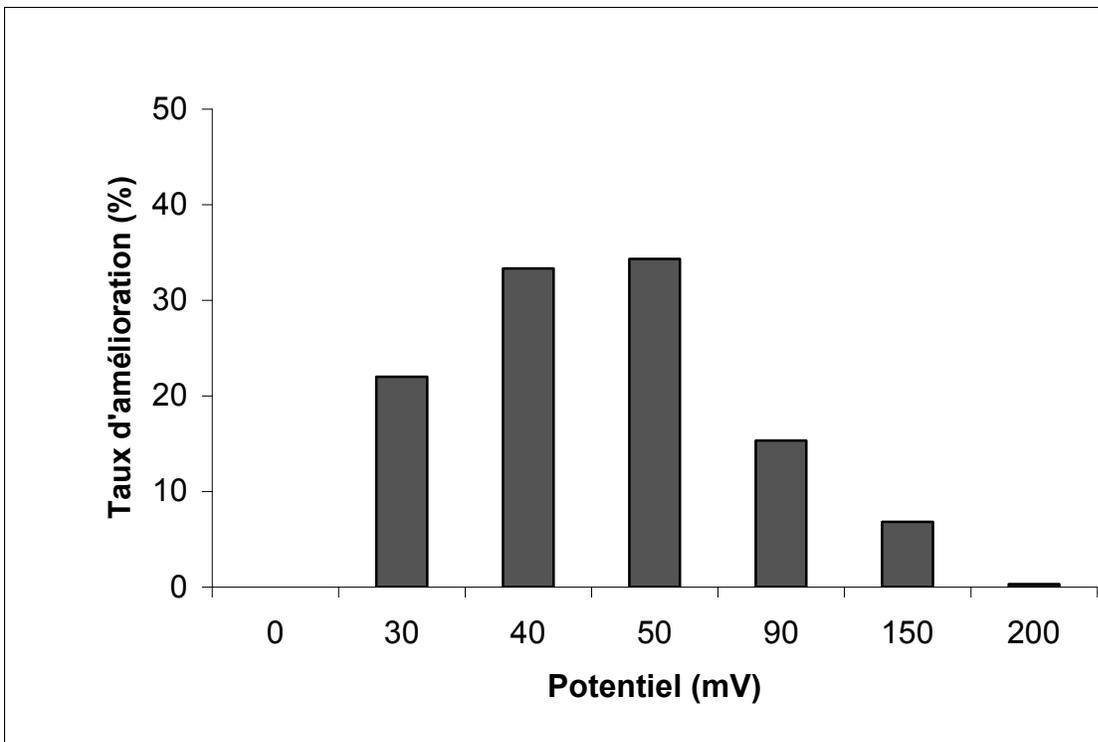


Figure 4.3d : Taux d'amélioration du rendement apporté par le champ électrique en fonction de la valeur appliquée

Ces résultats montrent que le potentiel électrique optimum dans la production du glucose serait de 50mv.

Au potentiel élevé, il est probable que l'enzyme, substance biologique, pourrait être altéré par celui-ci ; d'autre part, il y a risque de dépôt de l'enzyme au niveau de l'électrode de signe opposé.

4. Conclusion

Le but de ce travail était de voir l'influence du champ électrique sur la saccharification enzymatique du grignon d'olive.

Nous avons mis en évidence l'effet positif que produit le champ électrique sur l'activité enzymatique. Un champ électrique de 50mv améliore de 35% le rendement de saccharification par rapport à une hydrolyse sans champ électrique.

Une étude plus approfondie est actuellement menée sur le sujet en vue de déterminer l'évolution de l'état natif de l'enzyme sous l'effet du champ électrique.

Références bibliographiques

- [1] J. Pourquoi, J.Vandecastelle. Conversion des composés lignocellulosiques par hydrolyse enzymatique. Dans Biotechnologie, Scriban. Ed tech et Doc, Lavoisier, Paris (1993).
- [2] L. T. Fan, L. Young Huyun. The nature of lignocellulosics and their pre-treatment for enzymatic hydrolysis. *Advances in Biochemical engineering/ Biotechnology*,1994, 42, 156-182.
- [3] G. Augerinos, D. Wang. Selective solvent delignification of fermentation enhancement. *Biotech. And bioeng.*,1988, 25, 67-83.
- [4] I.M. Morrison. Influence of chemical and biological pre-treatment on the degradation of lignocellulosic material by biological systems. *Journal of science food agriculture*, 1988, 42, 295-304.
- [5] E. Vorobiev, N. I. Lebovka, M. I. Bazhal. Pulsed electric field treatment of apple tissue during compressing for juice extraction, 2001, 50, 3, 129-139.
- [6] N. Mameri, S. Oussedik, R. Yeddou, D. L. Piron, D. Belhocine, H. Lounici, H. Grib. Enhancement of ultrafiltration flux by coupling static turbulence promotor and electric field. *Separation and Purification Technology*, 1999, 17, 203-211.
- [7] S. Oussedik, D. Belhocine, H. Grib, H. Lounici, D. L. Piron, N. Mameri. Enhancement ultrafiltration of bovine serum albumin with pulsed electric field and fluidized activated alumina. *Desalination*, 2000, 127, 59-68.
- [8] H. Lounici, L. Adour, D. Belhocine, H. Grib, S. Nicolas, B. Bariou, N. Mameri. Study of a new technique for fluoride removal from water.. *Desalination*, 1997, 114, 241- 251.
- [9] N. Abdi, F. Halet, D.Belhocine, H. Lounici, H. Grib, D.L. Piron, N. Mameri, Enzymatic treatment of solid residue of olive mill in a batch reactor, *Biochem. Eng. J.* 6, 2000, 6, 177-183
- [10] L.G. Miller, Use of denitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 1959, 31 (3) 426-428.
- [11]N. Mameri, F. Hamdache, N. Abdi, D. Belhocine, H. Grib, H. Lounici, D.L. Piron, Enzymatic saccharification of olive mill solid residue in a membrane reactor, *J. Memb. Sci.* 2000, 121-130

PARTIE 2 VOLET 4

UTILISATION DES PLANS D'EXPERIENCES POUR DETERMINER LA ROBUSTESSE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE AU POINT DE FONCTIONNEMENT OPTIMUM

1. Introduction

Le but principal de ce travail est l'étude de l'aptitude de la réaction enzymatique à maintenir ses performances face à de faibles variations des conditions expérimentales au point de fonctionnement optimum. L'activité enzymatique étant très sensible aux conditions opératoires optimales, à savoir, température, pH et concentration en substrat. Pour réaliser l'objectif assigné, nous avons eu recours à la technique des plans d'expériences [1-5]. Les réponses que nous avons construites ont pour objectif de rendre compte des écarts par rapport à la valeur de consigne (au point de fonctionnement). L'exploitation utilise la technique de l'analyse de la variance et les calculs ont été menés à l'aide d'un logiciel de statistiques.

Nous essaierons de montrer comment il est possible de construire une fonction permettant de rendre compte de manière globale de la robustesse de l'hydrolyse enzymatique aux conditions optimales.

Un résidu solide de rejets d'huilerie, le grignon d'olive est utilisé pour tester la capacité du modèle mathématique et évaluer la saccharification du résidu solide par une cellulase, l'enzyme de *Trichoderma reesei* en mode discontinu et en mode continu avec couplage à un ultrafiltre [6-7].

2. Plan d'expériences utilisé

2.1 Choix du type de plan

Contrairement à ce qui peut être fait dans le cadre d'une optimisation de méthode, pour une étude de robustesse approfondie on ne peut se contenter d'un modèle polynomial de degré 1 (comme pourtant on le trouve fréquemment dans la littérature [5]). Ce qui équivaut à l'utilisation de plans factoriels complets 2^k ou factoriels fractionnaires 2^{k-p} . Il est nécessaire d'utiliser un modèle polynomial de degré au moins 2 [8], seul compatible avec la présence d'un extremum à l'intérieur du domaine expérimental. Parmi les plans permettant l'utilisation d'un modèle polynomial de degré 2, nous avons choisi un plan composite centré [9,10]. Ce dernier présente des qualités optimales quant à la prévision de la réponse calculée en tout

point du domaine. Le plan composite centré est en fait un plan factoriel de type 2^k (éventuellement factoriel fractionnaire 2^{k-p}) auquel on a ajouté des points dits en étoile et des points au centre. Une visualisation de la répartition des points expérimentaux dans l'espace des facteurs pour un plan composite centré à trois facteurs est donnée en Figure 5.1. Le nombre de points au centre ainsi que la distance des points axiaux au centre sont déterminés en fonction du critère d'isovariance par rotation (l'erreur sur le modèle de prédiction doit seulement être fonction de la distance au centre du plan)

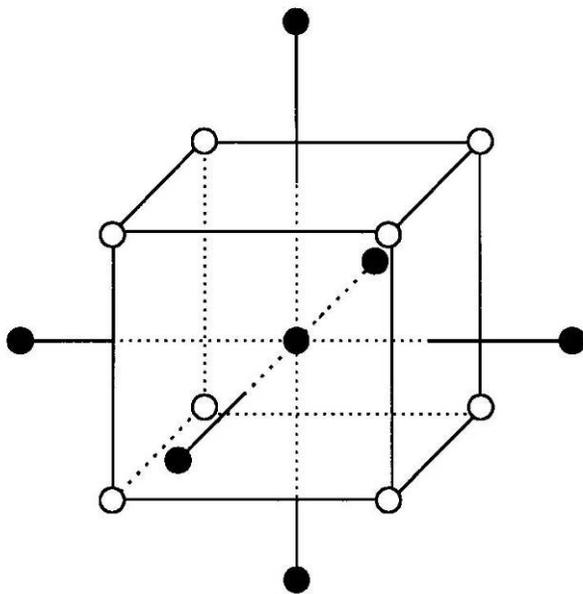


Figure 5.1 : Représentation dans un espace à trois facteurs d'un plan composite centré complet. En noir figurent les points en étoile et en blanc les points du plan factoriel

3. Réalisation expérimentale en mode discontinu

3.1 Appareillage utilisé

Les essais de saccharification par l'enzyme de *Trichoderma reesei* en mode discontinu sont réalisés dans un réacteur (1) de forme cylindrique de fond plat et de capacité 2 litres muni d'un thermostat à contact (2) d'un mélangeur (3) ; illustré sur la Figure 5.2

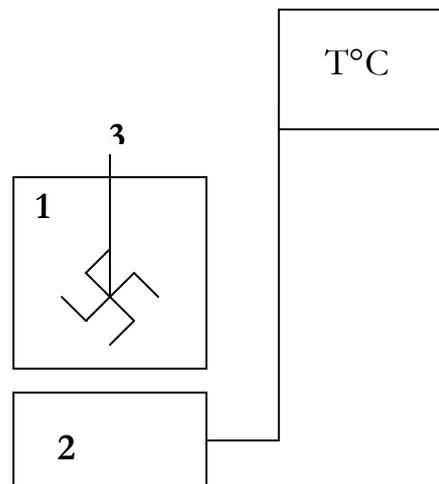


Figure 5.2 : Schéma du bioréacteur discontinu

La saccharification enzymatique par l'enzyme de *Trichoderma reesei* du résidu solide est réalisée aux point de fonctionnement optimum : pH5, $T=50^{\circ}\text{C}$ et $E/S= 0,1\text{g}$ d'enzyme par g de résidu solide à partir d'un substrat brut prétraitée aux conditions suivantes : température $T=100^{\circ}\text{C}$, un rapport $R= 20\text{g}$ de résidu solide/g de NaOH et un temps d'expérimentation de 1heure [6].

La détermination des sucres est effectuée au moyen du test standard au dinitro-salicylique [11].

L'activité enzymatique de l'enzyme de *Trichoderma reesei* est déterminée au moyen de la méthode développée par Mandels et Andreotti [12] qui utilise le papier filtre Wattman N°1 (50mg) comme substrat standard.

L'optimisation de la saccharification enzymatique du résidu solide : grignon d'olive a été réalisée en déterminant les performances de l'enzyme à différentes valeurs du pH (Figure 5.3) ; à différentes valeurs de température (Figure 5.4) ainsi que l'évolution du taux de saccharification en fonction de l'inverse de la concentration en substrat aux conditions optimales obtenues à savoir : $T=50^{\circ}\text{C}$; pH 5. Il apparaît une concentration optimale de $33,33\text{g/l}$ (équivalent à $1/S=0,03$) (Figure 5.5). Les résultats sont exprimés en rendement d'hydrolyse défini par le pourcentage de la cellulose hydrolysée par rapport à la quantité totale disponible dans le matériau.

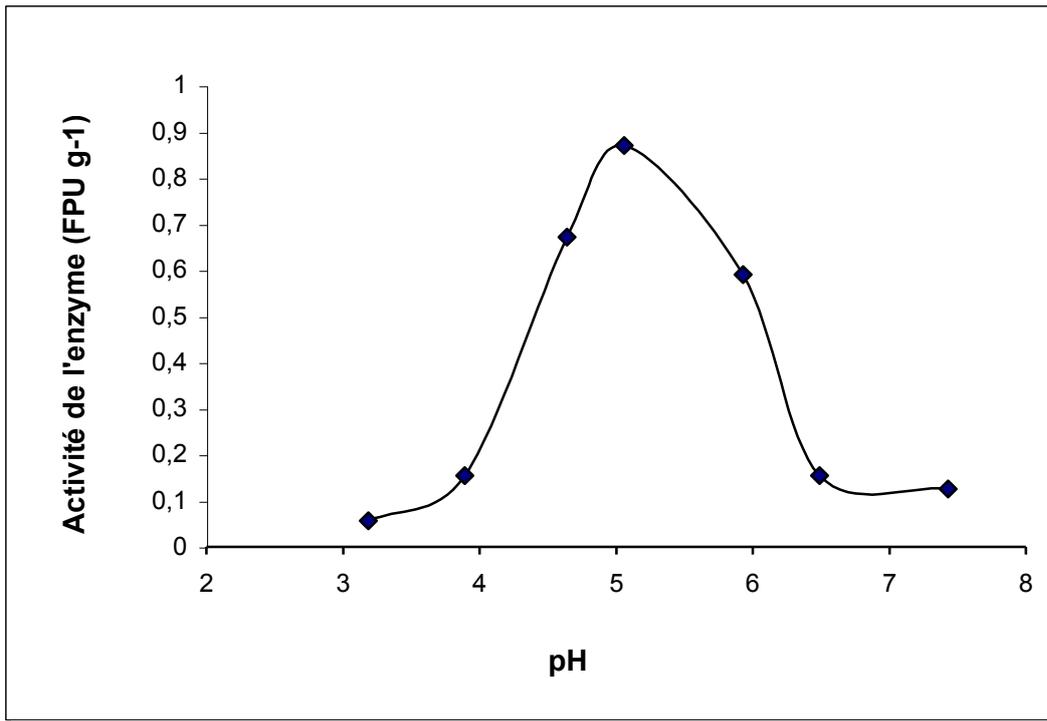


Figure 5.3: Effet du pH sur l'activité de l'enzyme; $T = 50^{\circ}\text{C}$, $v = 250$ tpm et conditions standard, [12], $S=33,4\text{g/l}$

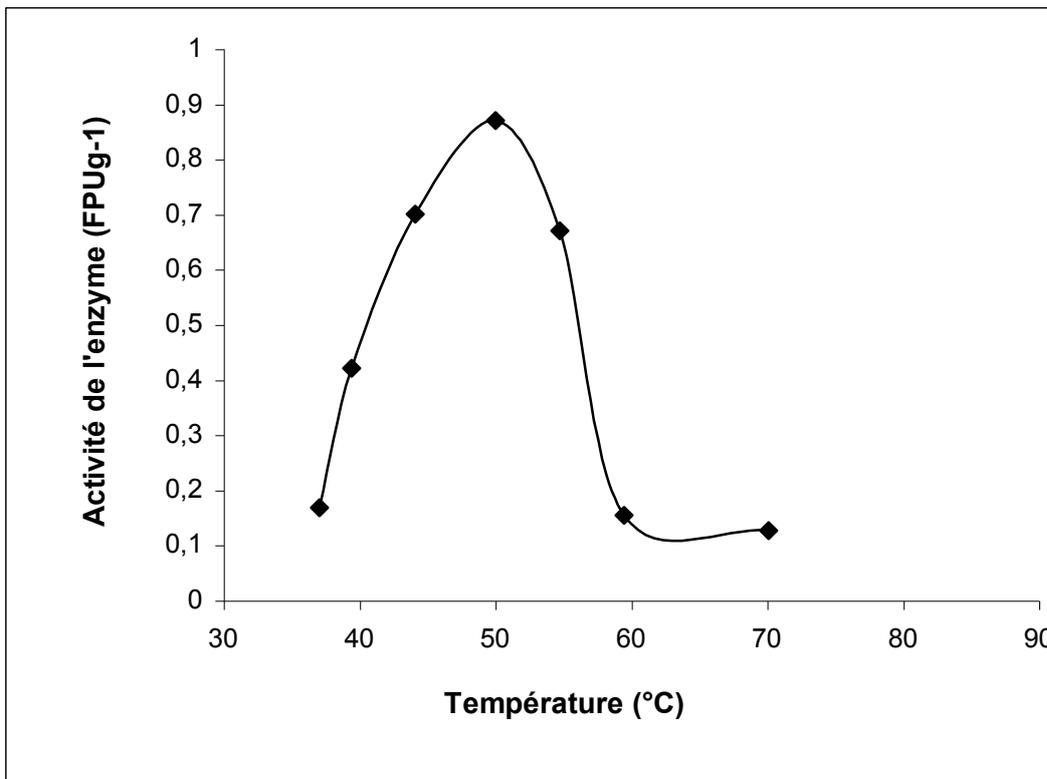


Figure 5.4 : Effet de la température sur l'activité de l'enzyme; $\text{pH} = 5$, $v = 250$ tpm, et conditions standard. [12], $S=33,4\text{g/l}$

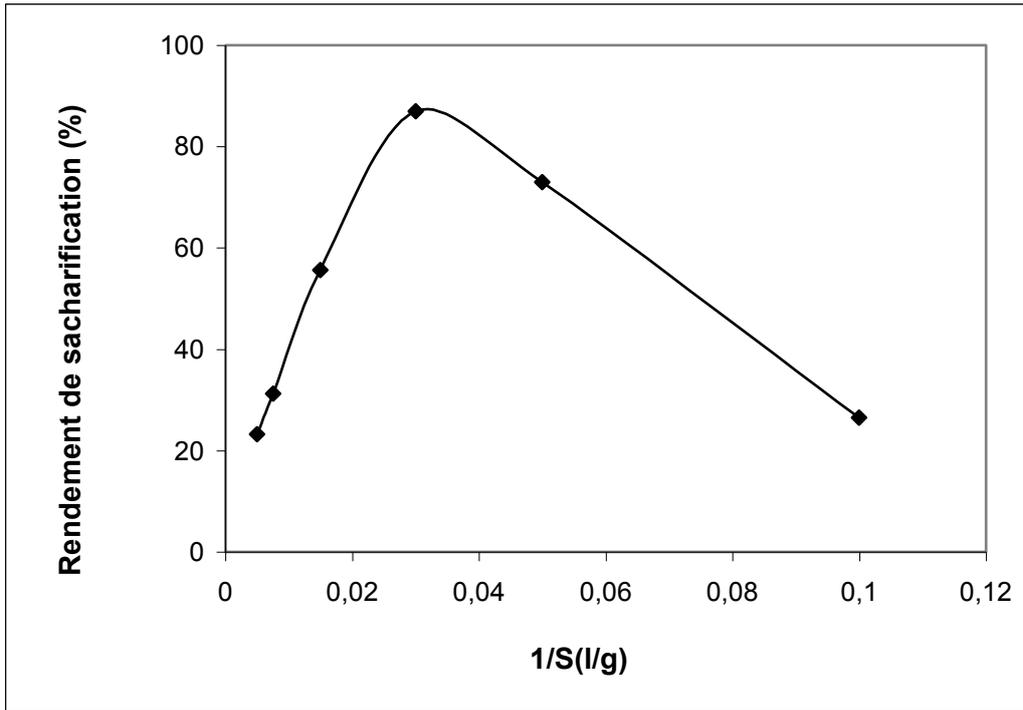


Figure 5.5 : Evolution du taux de saccharification en fonction de l'inverse de la concentration en substrat ; T=50°C et pH 5

4. Réalisation expérimentale en mode continu

4.1 Appareillage utilisé

Pendant la réaction de saccharification en discontinu, il est apparu des phénomènes d'inhibition que l'on attribue principalement aux produits de la réaction. La réalisation de la saccharification enzymatique du résidu solide de rejet d'huilerie dans un bioréacteur équipé de membranes minérales élimine cet effet d'inhibition. [7]

Le bioréacteur continu à membrane est illustré sur la Figure 5.6

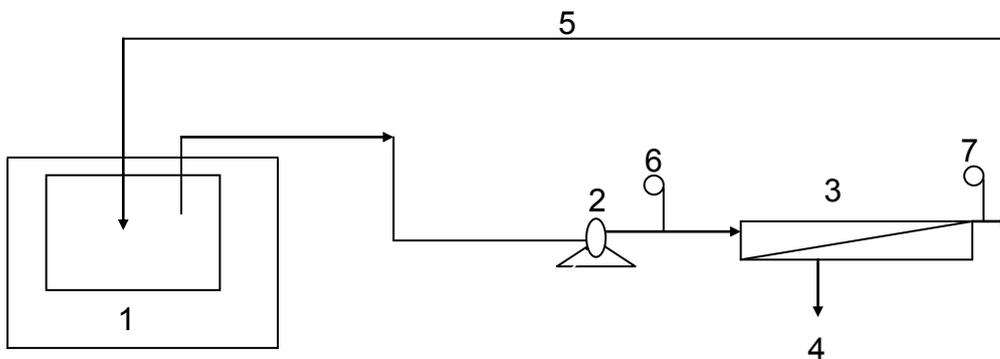


Figure 5.6 : Schéma du bioréacteur continu à membrane

(1) réacteur ; (2) pompe d'alimentation ; (3) cellule d'ultrafiltration ; (4) perméat ; (5) boucle de recyclage ; (6) et (7) manomètres.

La saccharification enzymatique du résidu solide a été réalisée aux conditions optimales [6]. Durant la première demi-heure, le bioréacteur continu à membrane fonctionne en faisant recirculer le perméat (c'est à dire que le perméat retourne dans le réacteur 1). Le recyclage du perméat est ensuite stoppé, et une solution fraîche est pompée dans le réacteur 1 à une vitesse égale au flux du perméat. Un volume de réaction constant est fixé pendant les expériences.

Le module de membrane est équipé d'une membrane d'ultrafiltration Carbosep M5 de seuil de coupure 10 kDa. La membrane Carbosep est composée de pores de ZrO_2 soutenus sur du carbone poreux. La surface de filtration du module est de $0,012 \text{ m}^2$.

La perméabilité hydraulique de la membrane M5 à l'eau préfiltrée est de 40 l/h bar m^2 . La filtration est réalisée sous une valeur moyenne de la pression transmembranaire $(P_1+P_2)/2$ de 0.08 MPa .

L'étude de l'influence de la vitesse tangentielle sur l'évolution du rendement de saccharification à différentes températures (Figure 5.7) et à différents pH (Figure 5.8) confirme les conditions optimales ($U=1,1\text{m/s}$, $\text{pH } 5$ et $T=50^\circ\text{C}$). Des expériences menées à une vitesse $U=1,1\text{m/s}$ (condition optimale) à permis de confirmer que les conditions optimales de fonctionnement (point de consigne) sont $\text{pH } 5$ et $T=50^\circ\text{C}$ (Figure 5.9)

Les résultats sont exprimés en rendement d'hydrolyse défini par le rapport de la cellulose hydrolysée par rapport à la quantité totale disponible dans le matériau

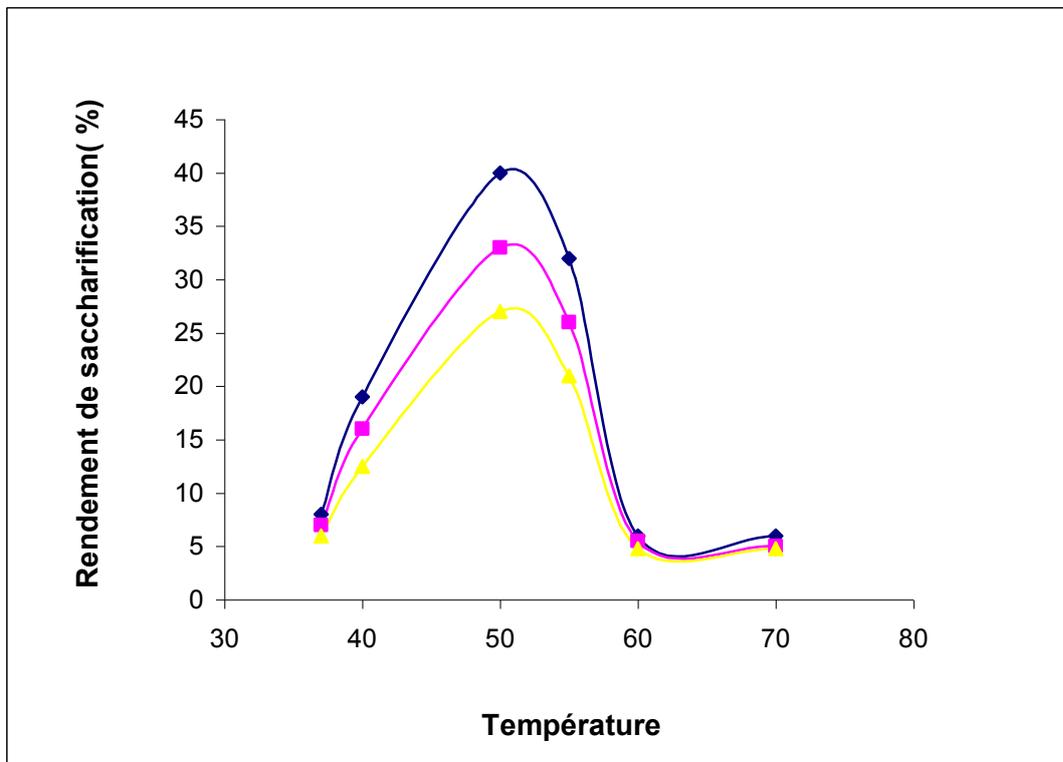


Figure 5.7 : Variation du rendement de saccharification avec la température à différentes vitesses tangentielles. $\text{pH } 5$; (♦) $U=1,1\text{m/s}$; (■) $U= 0,6\text{m/s}$; (▲) $U=0,3\text{m/s}$

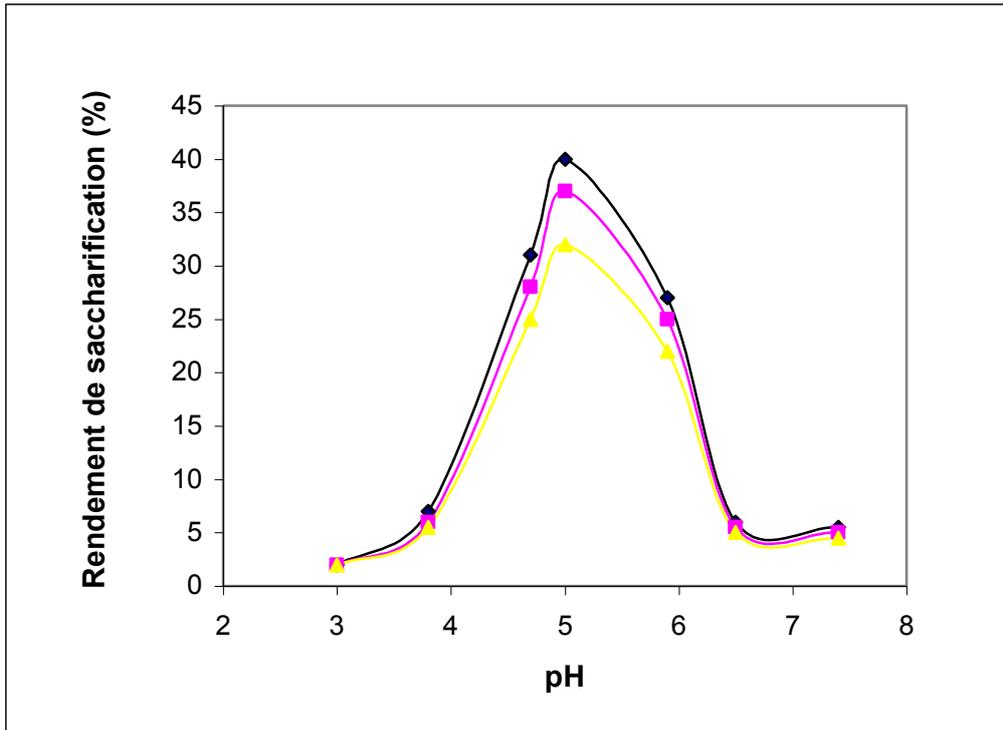


Figure 5.8 : Variation du rendement de saccharification avec le pH à différentes vitesses tangentielles. $T=50^{\circ}\text{C}$; (\blacklozenge) $U=1,1\text{m/s}$; (\blacksquare) $U=0,6\text{m/s}$; (\blacktriangle) $U=0,3\text{m/s}$

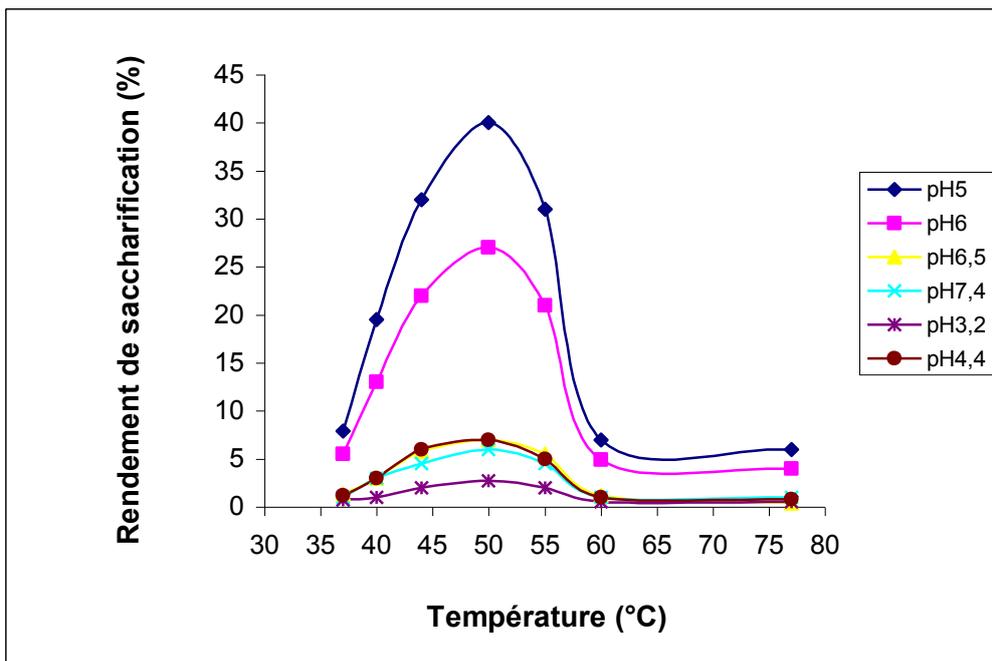


Figure 5.9 : Variation du rendement de saccharification avec la température à différentes valeurs du pH, vitesse optimale de recirculation = $1,1\text{m/s}$

La Figure 5.10 confirme bien nos précédentes conclusions (volet 2) relatives à l'effet combiné de la turbulence dynamique induite par les granules fluidisés du résidu solide et l'accumulation de l'enzyme à la surface de la couche de polarisation, qui augmente les performances de la saccharification dans le réacteur continu. En effet, la réduction du rayon des particules lignocellulosiques pendant l'expérience

les rend plus efficaces en réduisant la résistance hydraulique de la membrane. Ces particules se rapprochent de la couche de polarisation où la concentration en enzyme est 100 fois plus élevée que celle de la solution et induisent ainsi une augmentation du taux de saccharification [7].

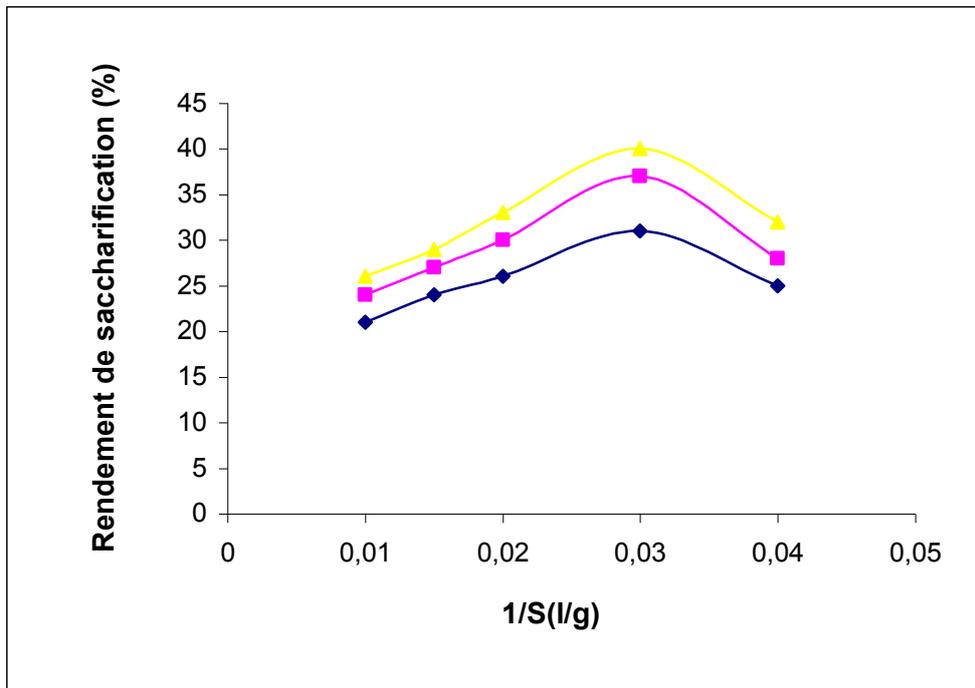


Figure 5.10 : Evolution du taux de saccharification en fonction de 1/S à différentes vitesses tangentielles. (▲)U=1,1m/s ; (■) U=0,6m/s ; (◆) U=0,3m/s

5. Présentation des facteurs contrôlés du modèle en mode discontinu et en mode continu

Les expériences préliminaires ainsi que les connaissances déjà acquises sur la méthode nous ont conduit à choisir dans un premier temps trois facteurs X_1 , X_2 , et X_3 pour ce qui concerne le fonctionnement en mode discontinu. Ce sont l'inverse de la concentration en substrat, la température et le pH.

Le plan que nous avons décidé de retenir pour notre étude comporte 20 essais répartis de la manière suivante : 8 pour le plan factoriel complet 2^3 , 6 pour les points axiaux et 6 points au centre. Ces derniers vont permettre d'estimer la répétabilité de la méthode et donc de tester la significativité des coefficients du modèle. Ce type de plan nous permet d'utiliser un modèle polynomial de degré 2 pour l'exploitation des résultats. L'équation du modèle postulé est la suivante :

$$Y(X_{i,1 \leq i \leq 3}) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=2}^3 \sum_{j=1}^{i-1} \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

$Y(X_{i, 1 \leq i \leq 3})$ est la réponse théorique qui correspond au taux de saccharification calculé d'après le modèle. Elle est fonction des trois facteurs contrôlés X_i ($i=1$ à 3). $\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ sont les coefficients du modèle. Le troisième terme du second membre de l'équation (1) représentant un polynôme de degré 2 est nécessaire pour rendre compte de la présence d'un optimum à l'intérieur du domaine expérimental [5]. Le quatrième terme rend compte des différentes influences des paramètres entre eux.

La réponse expérimentale $R(X_{i, 1 \leq i \leq 3})$ qui correspond au taux de saccharification mesuré est alors $R(X_{i, 1 \leq i \leq 3}) = Y(X_{i, 1 \leq i \leq 3}) + \varepsilon$; avec ε : variable normale d'espérance mathématique nulle et de variance constante σ^2 , qui correspond aux erreurs aléatoires de mesure. On recherche les estimations b_i, b_{ii}, b_{ij} des coefficients du modèle mais on ne s'intéresse pas directement aux effets des facteurs.

Pour un plan composite centré à 3 facteurs, le critère d'isovariance par rotation est vérifié lorsque la distance des points axiaux au centre du domaine est égale $\pm\alpha$ (en variables réduites). L'ensemble de ces considérations nous a conduit à fixer des niveaux de facteurs comme indiqués sur le tableau 5.1

Les niveaux des facteurs sont exprimés en valeurs centrées réduites : 0 représente le niveau au point de fonctionnement optimal (centre du domaine), -1 et $+1$ respectivement les niveaux bas et haut pour les points factoriels, $-\alpha$ et $+\alpha$ respectivement les niveaux bas et haut pour les points axiaux. La valeur α est choisie égale à 1,68 ; valeur généralement admise en génie des procédés [13]

De même, pour le fonctionnement en mode continu, les expériences préliminaires nous ont conduit à choisir quatre facteurs X_1, X_2, X_3 et X_4 . Ce sont respectivement l'inverse de la concentration en substrat, la vitesse tangentielle, le pH et la température. Le plan que nous avons décidé de retenir pour notre étude comporte 30 essais répartis de la manière suivante : 16 pour le plan factoriel 2^4 , 8 pour les points axiaux et 6 points au centre qui vont permettre d'estimer la répétitivité de la méthode et donc de tester la significativité des coefficients du modèle. Ce type de plan nous permet d'utiliser un modèle polynomial de degré 2 pour l'exploitation des résultats. L'équation du modèle postulé est la suivante :

$$Y(X_{i, 1 \leq i \leq 4}) = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=2}^4 \sum_{j=1}^{i-1} \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

$Y(X_{i, 1 \leq i \leq 4})$ est la réponse théorique, elle est fonction des quatre facteurs contrôlés X_i ($i=1$ à 4). $\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}, \beta_{ji}$ sont les coefficients du modèle.

La réponse expérimentale $R(X_{i, 1 \leq i \leq 4})$ est alors $R(X_{i, 1 \leq i \leq 4}) = Y(X_{i, 1 \leq i \leq 4}) + \varepsilon$

On recherche les estimations b_i, b_{ii}, b_{ij} et b_{ji} des coefficients du modèle mais on ne s'intéresse pas directement aux effets des facteurs.

Pour un plan composite centré à 4 facteurs, le critère d'isovariance par rotation est vérifié lorsque la distance des points axiaux au centre du domaine est égale $\pm\alpha$ (en

variables réduites). L'ensemble de ces considérations nous a conduit à fixer des niveaux de facteurs comme indiqués dans le tableau 5.2

Les niveaux des facteurs sont exprimés en valeurs centrées réduites : 0 représente le niveau au point de fonctionnement optimal (centre du domaine), -1 et +1 respectivement les niveaux bas et haut pour les points factoriels, $-\alpha$ et $+\alpha$ respectivement les niveaux bas et haut pour les points axiaux. Dans ce mode de fonctionnement en continu, nous choisissons également $\alpha = 1,68$

Il est clair que l'ordre indiqué dans les tableaux 6.1 et 6.2 correspond à l'ordre de construction de la matrice des expériences et non à l'ordre dans lequel les essais ont été effectués.

Tableau 5.1 : Niveaux des facteurs (En mode discontinu)

Variables	Codes Symboles	Niveau bas		Point central	Niveau haut	
		axial	Factoriel	Point central	Factoriel	Axial
		$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
		Valeurs non codées				
1/S	X ₁	0,005333	0,016667	0,033333	0,050000	0,061333
T°	X ₂	33,2	40	50	60	66,8
pH	X ₃	1,976	3,2	5	6,8	8,02

Tableau 5.2 : Niveaux des facteurs (En mode continu)

Variables	Codes Symboles	Niveau bas		Point central	Niveau haut	
		axial	Factoriel	Point central	Factoriel	Axial
		$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
		Valeurs non codées				
1/S	X ₁	0,064	0,02	0,03	0,04	0,4136
U	X ₂	0,296	0,5	0,7	1,1	1,304
T	X ₃	33,2	40	50	60	66,8
pH	X ₄	3,32	4	5	6	6,68

6. Plan d'expérimentation

L'ensemble des expériences réalisées au laboratoire est représenté dans les tableaux 6.1 et 6.2

Tableau 6.1 : Structure du plan d'expériences Cas discontinu

N° de Manip	Variables réduites			Variables correspondantes		
	X ₁	X ₂	X ₃	1/S	T°	pH
1	1	1	1	0,0500	60	6,8
2	1	1	-1	0,0500	60	3,2
3	1	-1	1	0,0500	40	6,8
4	1	-1	-1	0,0500	40	3,2
5	-1	1	1	0,0167	60	6,8
6	-1	1	-1	0,0167	60	3,2
7	-1	-1	1	0,0167	40	6,8
8	-1	-1	-1	0,0167	40	3,2
9	- α	0	0	0,0053	50	5
10	+ α	0	0	0,0613	50	5
11	0	- α	0	0,0333	33,2	5
12	0	+ α	0	0,0333	66,8	5
13	0	0	- α	0,0333	50	1,976
14	0	0	+ α	0,0333	50	8,024
15	0	0	0	0,0333	50	5
16	0	0	0	0,0333	50	5
17	0	0	0	0,0333	50	5
18	0	0	0	0,0333	50	5
19	0	0	0	0,0333	50	5
20	0	0	0	0,0333	50	5

Avec $\alpha=1,68$

X₁: 1/S (l/g); X₂: T (°C); X₃: pH

Tableau 6.2 : Structure du plan d'expériences Cas continu

N° manip.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	1/S	U	T°	pH
1	1	1	1	1	0,04	1,1	60	6
2	1	1	1	-1	0,04	1,1	60	4
3	1	1	-1	1	0,04	1,1	40	6
4	1	1	-1	-1	0,04	1,1	40	4
5	1	-1	1	1	0,04	0,5	60	6
6	1	-1	1	-1	0,04	0,5	60	4
7	1	-1	-1	1	0,04	0,5	40	6
8	1	-1	-1	-1	0,04	0,5	40	4
9	-1	1	1	1	0,02	1,1	60	6
10	-1	1	1	-1	0,02	1,1	60	4
11	-1	1	-1	1	0,02	1,1	40	6
12	-1	1	-1	-1	0,02	1,1	40	4
13	-1	-1	1	1	0,02	0,5	60	6
14	-1	-1	1	-1	0,02	0,5	60	4
15	-1	-1	-1	1	0,02	0,5	40	6
16	-1	-1	-1	-1	0,02	0,5	40	4
17	- α	0	0	0	0,064	0,8	50	5
18	+ α	0	0	0	0,4136	0,8	50	5
19	0	- α	0	0	0,03	0,296	50	5
20	0	+ α	0	0	0,03	1,304	50	5
21	0	0	- α	0	0,03	0,8	33,2	5
22	0	0	+ α	0	0,03	0,8	66,8	5
23	0	0	0	- α	0,03	0,8	50	3,32
24	0	0	0	+ α	0,03	0,8	50	6,68
25	0	0	0	0	0,03	0,8	50	5
26	0	0	0	0	0,03	0,8	50	5
27	0	0	0	0	0,03	0,8	50	5
28	0	0	0	0	0,03	0,8	50	5
29	0	0	0	0	0,03	0,8	50	5
30	0	0	0	0	0,03	0,8	50	5

Avec $\alpha=1,68$

X₁ : 1/S(l/g) ; X₂ : U(m/s) ; X₃ : T (°C) ; X₄: pH

Les réponses expérimentales et les valeurs réduites sont présentées sur les tableaux 6.3 et 6.4

Tableau 6.3 : Tableau des réponses expérimentales et valeurs réduites. Cas discontinu

R	X₁	X₂	X₃	X₁²	X₂²	X₃²	X₁X₂	X₁X₃	X₂X₃	X₁X₂X₃
0,08	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0,07	1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
0,12	1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1
0,11	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1
0,08	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	-1
0,07	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1
0,13	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1
0,11	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1
0,14	-1,68	0	0	2,8224	0	0	0	0	0	0
0,62	1,68	0	0	2,8224	0	0	0	0	0	0
0,11	0	-1,68	0	0	2,8224	0	0	0	0	0
0,1	0	1,68	0	0	2,8224	0	0	0	0	0
0,05	0	0	-1,68	0	0	2,8224	0	0	0	0
0,05	0	0	1,68	0	0	2,8224	0	0	0	0
0,86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 6.4 : Tableau des réponses expérimentales et valeurs réduites. Cas continu

R	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁ ²	X ₂ ²	X ₃ ²	X ₄ ²	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₁ X ₄	X ₂ X ₃	X ₂ X ₄	X ₃ X ₄
0,06	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0,06	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1
0,18	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1
0,07	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
0,05	1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1
0,05	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1
0,1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
0,04	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1
0,06	-1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1
0,06	-1	1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
0,16	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1
0,07	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1
0,05	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
0,05	-1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1
0,1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1
0,04	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0,27	-1,68	0	0	0	2,8224	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,29	1,68	0	0	0	2,8224	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,33	0	-1,68	0	0	0	2,8224	0	0	0	0	0	0	0	0
0,41	0	1,68	0	0	0	2,8224	0	0	0	0	0	0	0	0
0,06	0	0	-1,68	0	0	0	2,8224	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	1,68	0	0	0	2,8224	0	0	0	0	0	0	0
0,03	0	0	0	-1,68	0	0	0	2,8224	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	1,68	0	0	0	2,8224	0	0	0	0	0	0
0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0

7. Résultats

a) Application du modèle à 3 facteurs pour le mode discontinu

L'équation (1) s'écrira de la manière suivante :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_1^2 + \beta_5 X_2^2 + \beta_6 X_3^2 + \beta_7 X_1 X_2 + \beta_8 X_1 X_3 + \beta_9 X_2 X_3 + \beta_{10} X_1 X_2 X_3 \quad (3)$$

Tableau 7.1 : Détermination des coefficient du modèle en discontinu avec interaction des paramètres

		<i>Coefficients</i>	<i>Erreur-type</i>	<i>Limite inférieure pour seuil de confiance = 95%</i>	<i>Limite supérieure pour seuil de confiance = 95%</i>
Constante	β_0	0,8646354	0,0372625	0,7803418	0,9489290
X_1	β_1	0,0583665	0,0247355	0,0024109	0,1143222
X_2	β_2	-0,0136902	0,0247355	-0,0696458	0,0422654
X_3	β_3	0,0036644	0,0247355	-0,0522912	0,0596200
X_1^2	β_4	-0,1795032	0,0241071	-0,2340372	-0,1249691
X_2^2	β_5	-0,2769380	0,0241071	-0,3314721	-0,2224039
X_3^2	β_6	-0,2964249	0,0241071	-0,3509590	-0,2418910
$X_1 X_2$	β_7	0,0012500	0,0323042	-0,0718273	0,0743273
$X_1 X_3$	β_8	-0,0012500	0,0323042	-0,0743273	0,0718273
$X_2 X_3$	β_9	-0,0012500	0,0323042	-0,0743273	0,0718273
$X_1 X_2 X_3$	β_{10}	0,0012500	0,0323042	-0,0718273	0,0743273

Tableau 7.2 : Statistiques de la régression du modèle

<i>Statistiques de la régression</i>	
Coefficient de détermination multiple R	0,9849646
Coefficient de détermination R ²	0,9701552
Erreur-type	0,0913702
Observations	20

Les résultats obtenus suite à l'application du modèle sont présentés au tableau 7.1. Nous remarquons que la contribution des constantes est faible. De même, les coefficients β_7 , β_8 , β_9 et β_{10} apparaissent très faible, voire négligeables en valeurs. On peut affirmer que les interactions entre les paramètres d'étude sont négligeables.

- En conclusion, il est clair que les coefficients β_4 ; β_5 et β_6 présentent des valeurs significatives indiquant que le modèle s'appuiera essentiellement sur un polynôme de degré 2. Ce résultat était attendu, du fait de la présence d'un optimum lors de l'hydrolyse enzymatique. Pour confirmer notre conclusion,

nous avons appliqué le modèle en n'utilisant que le polynôme de degré 2, présenté par l'équation suivante :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \beta_3 X_3^2 \quad (4)$$

Tableau 7.3 : Détermination des coefficients du modèle en discontinu sans interactions des paramètres

	<i>Coefficients</i>	<i>Erreur-type</i>	<i>Limite inférieure pour seuil de confiance = 95%</i>	<i>Limite supérieure pour seuil de confiance = 95%</i>	
Constante	β_0	0,8646354	0,0359613	0,7884008	0,940870
X_1^2	β_1	-0,1795032	0,0232653	-0,2288234	-0,1301829
X_2^2	β_2	-0,2769380	0,0232653	-0,3262582	-0,2276178
X_3^2	β_3	-0,2964249	0,0232653	-0,3457452	-0,2471047

Tableau 7.4 : Statistiques de la régression du modèle

<i>Statistiques de la régression</i>	
Coefficient de détermination multiple R	0,9749786
Coefficient de détermination R2	0,9505834
Erreur-type	0,0881796
Observations	20

b) Application du modèle à 4 facteurs pour le mode continu

L'équation peut s'écrire de la manière suivante :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_1^2 + \beta_6 X_2^2 + \beta_7 X_3^2 + \beta_8 X_4^2 + \beta_9 X_1 X_2 + \beta_{10} X_1 X_3 + \beta_{11} X_1 X_4 + \beta_{12} X_2 X_3 + \beta_{13} X_2 X_4 + \beta_{14} X_3 X_4 \quad (5)$$

Tableau 7.5: Détermination des coefficients du modèle avec interactions

		<i>Coefficients</i>	<i>Erreur-type</i>	<i>Limite inférieure pour seuil de confiance = 95%</i>	<i>Limite supérieure pour seuil de confiance = 95%</i>
Constante	β_0	0,4048387	0,0482818	0,2802993	0,4861200
X_1	β_1	0,0024763	0,0245820	-0,0499189	0,0548716
X_2	β_2	0,0180736	0,0245820	-0,0350978	0,0696929
X_3	β_3	-0,0155603	0,0245820	-0,0679555	0,0368350
X_4	β_4	0,0163364	0,0245820	-0,0360587	0,0687317
X_1^2	β_5	-0,0485989	0,0285893	-0,1215399	0,00033333
X_2^2	β_6	-0,0149396	0,0285893	-0,0896521	0,0322211
X_3^2	β_7	-0,1283183	0,0285893	-0,2012593	-0,0793860
X_4^2	β_8	-0,1336329	0,0203958	-0,0981071	-0,0111626
X_1X_2	β_9	0,0012500	0,0285913	-0,0596908	0,0621908
X_1X_3	β_{10}	-0,0012500	0,0285913	-0,0621908	0,0596908
X_1X_4	β_{11}	0,0012500	0,0285913	-0,0596908	0,0621908
X_2X_3	β_{12}	-0,0100000	0,0285913	-0,0709408	0,0509408
X_2X_4	β_{13}	0,0050000	0,0285913	-0,0559408	0,0659408
X_3X_4	β_{14}	-0,0200000	0,0285913	-0,0809408	0,0409408

Tableau 7.6 : Statistiques de la régression du modèle

Statistiques de la régression	
Coefficient de détermination multiple R	0,8345216
Coefficient de détermination R ²	0,6964264
Erreur-type	0,1143651
Observations	30

Les résultats donnant les différents coefficients sont présentés sur le tableau 7.5 ; Nous constatons que les interactions entre paramètres sont faibles. Ce résultat obtenu en mode continu est similaire aux résultats obtenus en mode discontinu. Le coefficient de détermination multiple de 0,835 est satisfaisant mais plus faible que celui obtenu en mode discontinu ($R = 0,975$). La contribution du paramètre substrat semble faible relativement aux autres paramètres. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en mode continu l'effet d'inhibition par le substrat a été éliminé. Ce qui n'était pas le cas en mode discontinu où, une forte influence, de ce paramètre sur la réaction enzymatique, est constatée.

Nous avons voulu déterminer la capacité du polynôme de degré 2 de rendre compte de l'expérience enzymatique en appliquant l'équation (6) suivante :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \beta_3 X_3^2 + \beta_4 X_4^2 \quad (6)$$

Tableau 7.7: Détermination des coefficients du modèle sans interaction

		<i>Coefficients</i>	<i>Erreur-type</i>	<i>Limite inférieure pour seuil de confiance = 95%</i>	<i>Limite supérieure pour seuil de confiance = 95%</i>
Constante	β_0	0,3832097	0,0398091	0,3012213	0,4651980
X_1^2	β_1	-0,0606033	0,0235723	-0,1091513	-0,0120553
X_2^2	β_2	-0,0287155	0,0235723	-0,0772635	0,0198325
X_3^2	β_3	-0,1403227	0,0235723	-0,1888707	-0,0917747
X_4^2	β_4	-0,0546353	0,0168167	-0,0892698	-0,0200007

Tableau 7.8 : Statistiques de la régression du modèle

<i>Statistiques de la régression</i>	
Coefficient de détermination multiple R	0,8099623
Coefficient de détermination R ²	0,6560389
Erreur-type	0,0942956
Observations	30

Nous constatons que le coefficient de détermination multiple est pratiquement du même ordre de grandeur que celui déterminé en tenant compte des interactions des paramètres. Ce résultat confirme ce que nous avons obtenu en mode discontinu, à savoir que, dans le cas d'expérimentations présentant des optimums, la forme polynôme de degré 2 est suffisante pour rendre compte du modèle.

8. Conclusion

Il s'est avéré que le plan d'expérience utilisé était apte à prédire avec une très bonne approximation le phénomène enzymatique en discontinu et, avec une moindre précision le procédé en mode continu.

La méthode des plans d'expériences paraît bien adaptée à l'étude de l'aptitude de la réaction enzymatique à maintenir ses performances dans les conditions de l'analyse.

Références bibliographiques

- [1] J. Goupy, In : La méthodes des plans d'expériences, Dunod, Paris, 1988.
- [2] K. Jones, Optimization of experimental data, International Laboratory, 1986 16, 9, 32-45.
- [3] M. Mulholland, J. Waterhouse; Development and evaluation of an automated procedure for the ruggedness testing of chromatographic conditions in high-performance liquid chromatography; J. Chromatogr. 1987, 395, 539-551.
- [4] M. Mulholland ; Waterhouse, J. Chem. Intell. Lab. Syst. 1989, 5, 263-270.
- [5] J. Vial; A. Jardy, Utilisation des plans d'expériences pour évaluer la robustesse d'une méthode d'analyse quantitative par chromatographie en phase liquide, Analisis, 1998, 26, 15-24.
- [6] N. Abdi, F. Halet, D. Belhocine, H. Lounici, H. Grib, D.L. Piron, N. Mameri, Enzymatic treatment of solid residue of olive mill in a batch reactor, Biochem. Eng. J.2000, 6, 177-183.
- [7] N. Mameri ; F. Hamdache ; N. Abdi ; D. Belhocine ; H. Grib ; H. Lounici ; D. L. Piron, Enzymatic saccharification of olive mill solid residue in a membrane reactor, J. Memb. Sci., 2000, 178, 121-130.
- [8] B. Bourguignon; F. Marcenac; H. R. Keller ; P.F. de Aguiar ; D. L. Massart , J. Chromatogr. 1993, 628, 171-189.
- [9] M. Mulholland, Trends Anal. Chem. 1988, 7(10), 383-389.
- [10] M.M.W. B. Hendriks; J. H. De Boer ; A. K. Smilde , In : Robustness of analytical chemical methods and pharmaceutical products, Data Handling in Science and technology, Vol. 19; Elsevier, Amsterdam, 1996.
- [11] L.G. Miller, Use of denitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem. 1959, 31 (3) 426-428.
- [12] M.Mandels, R. Andreotti , Measurement of saccharification cellulose, Biotechnol.Bioeng , Symp. 1976, 6, 21-33.
- [13] M. Drouiche, H. Lounici, N. Mameri, D.L. Piron, M. Kharrourne, Utilisation of factorial experiments for the UV/H₂O₂ process in a batch reactor, Water SA, 2001,27, (4)551-

CONCLUSION GENERALE

Notre travail avait pour but la valorisation d'un résidu protéique solide de rejets de poissonnerie et un matériel lignocellulosique « le grignon d'olive » résidu solide des rejets d'huilerie.

Au cours de nos travaux, nous avons montré que la voie enzymatique permet à partir de ces résidus de produire des hydrolysats à haute valeur ajoutée qui contiennent des peptides et acides aminés dans le cas des rejets de poissonneries et des sucres dans le cas du grignon d'olive.

L'hydrolyse enzymatique des rejets de poissonnerie a été conduite en présence d'une enzyme brute « la pepsine » préparée par autodigestion de la muqueuse stomacale du mouton en milieu acide pendant 12 heures. Celle-ci serait utilisée lors du processus dans les conditions optimales suivantes : $\text{pH} = 1,5 - 2$; $T = 48^\circ\text{C}$; muqueuse en poids sec / rejet humide = 2/100 ; taux de dilution = 1/1 ; régime de mélange $v = 300-400$ tpm.

L'étude de la cinétique d'hydrolyse par la pepsine révèle une cinétique Michaëlienne et l'existence d'une inhibition par le substrat, pour les fortes concentrations de protéines supérieures à 14g/l.

Les constantes cinétiques obtenues graphiquement sont : $K_m = 16,7\text{g}$ de protéines/l et $V_m = 8,3\text{g}$ de protéines/l min

Les essais d'hydrolyse réalisés ont donné des taux d'hydrolyse importants à l'échelle de bécher, alors que l'hydrolyse à l'échelle semi-pilote dans un réacteur de capacité 60 litres a donné un taux d'hydrolyse plus faible 63%. Cette perte de rendement lors du scale-up est imputable à la maîtrise des paramètres hydrodynamiques du mélange réactionnel.

Le couplage des deux techniques : hydrolyse enzymatique et ultrafiltration en vue de réaliser l'opération de concentration s'est avéré intéressante avec des taux de rejet de l'ordre de 90%. En effet, celui-ci est fortement dépendant de la pression transmembranaire et, la couche dynamique joue le rôle de membrane avec une porosité dépendante de la pression transmembranaire. Il se produit une diminution du rayon de pores moyen suite à l'adsorption des différents solutés à la surface des pores.

Par ailleurs, ces taux de rejet de l'ordre de 90% rendent l'opération de séchage moins énergivore et donc le coût de production des FPH serait plus intéressant. De même, la qualité nutritionnelle des FPH produites est satisfaisante. Il est donc suggéré de réaliser un séchage de l'hydrolysate par pulvérisation et, par la suite de l'incorporer aux rations alimentaires animales afin de mettre en évidence la valeur nutritive réelle de notre produit.

La deuxième partie de notre étude concerne d'une part, l'optimisation de la saccharification des rejets de moulin d'huilerie après prétraitement à l'hydroxyde de soude et l'hydrolyse en présence d'une cellulase commerciale : l'enzyme de *Trichoderma reesei* et, d'autre part le couplage de la réaction enzymatique à l'ultrafiltration dans le but d'améliorer le rendement de la saccharification de la cellulose en glucose et de séparer les sucres de l'enzyme.

La saccharification a été conduite en présence de l'enzyme de *Trichoderma reesei* après prétraitement alcalin aux conditions optimales suivantes : $T= 100^{\circ}\text{C}$, $R= 20\text{g}$ de résidu solide/g de NaOH et une durée de prétraitement de 1 heure.

Le prétraitement à la soude accélère la saccharification d'un facteur de 2,5 comme le montre le rendement de saccharification (il passe de 20 à 50%).

L'activité de la cellulase est maximale à pH 5 ; l'optimum de la température se situe à 50°C . L'enzyme de *Trichoderma reesei* devrait être utilisée dans la bioconversion du résidu solide de grignon d'olive en sucre dans les conditions optimales suivantes : pH =5, $T=50^{\circ}\text{C}$ et $E/S= 0,1\text{g}$ d'enzyme / g de grignon ; conduisant à un rendement de 50%.

Les rendements de saccharification obtenus au bout de 24 heures sont du même ordre de grandeur que ceux concernant la saccharification des matériaux lignocellulosiques.

L'étude cinétique de la saccharification révèle l'existence d'une inhibition par le substrat pour les fortes concentrations en substrat supérieure à 40g/l. Les constantes cinétiques déterminées sont des constantes apparentes déterminées à partir d'un modèle simple qui ne prend pas en compte l'inhibition de l'enzyme causée par la variation des paramètres : $K_m = 800\text{g/l}$ et $V_m = 0,1\text{ g/l.min}$

Le phénomène d'inhibition rencontré durant la réaction enzymatique serait attribué aux produits de la réaction particulièrement au cellobiose considéré comme un fort inhibiteur enzymatique.

L'étude de la saccharification enzymatique d'un résidu solide de rejet d'huilerie dans un bioréacteur équipé de membranes d'ultrafiltration minérales a permis de mettre en évidence que :

Un rendement de saccharification de 45% au bout de 12 heures tandis que le réacteur fonctionnant en batch requiert 24 heures.

Le réacteur continu possède les meilleures performances à une vitesse de recirculation de 1,1m/s et une pression transmembranaire de 1,3 bars. Celles-ci

permettraient d'obtenir un rendement de saccharification de 45% et une productivité maximale.

La cinétique de la saccharification enzymatique en réacteur continu à membrane est de type michaelienne. La constante $K_m = 217\text{g/l}$ est 3 fois moins élevée que celle obtenue en réacteur discontinu témoignant ainsi de la grande affinité de la cellulase pour la cellulose en réacteur continu. Les constantes $V_m = 0,145\text{g/lmin}$ sont du même ordre de grandeur.

L'ultrafiltration en continu nous a permis de lever l'effet d'inhibition malgré les concentrations du substrat 2,5 fois plus grandes que la concentration limite obtenue en système batch.

Il a été ainsi démontré qu'une bonne maîtrise de la réaction enzymatique et son couplage à une technique membranaire permettait d'accroître considérablement l'efficacité et la rentabilité économique de la valorisation de rejets solides, produits à forte charge polluante et considérés comme récalcitrants, en produits à haute valeur ajoutée.

Le couplage bioréacteur/champ électrique améliore la saccharification du grignon d'olive. En effet, l'application du champ électrique optimisé à 50mv permet une amélioration du rendement de saccharification de 35 % par rapport à une hydrolyse sans champ électrique.

L'objectif de l'étude de la robustesse de la réaction enzymatique était d'examiner l'incidence des faibles variations fortuites des facteurs autour de leurs valeurs de consigne sur les performances de processus. La méthode des plans d'expériences paraît bien adaptée à l'étude de cette robustesse. L'application du modèle en mode discontinu a montré que les interactions entre paramètres d'étude étaient négligeables, et que le modèle s'appuiera essentiellement sur un polynôme de degré 2 présenté par l'équation :

$$Y = 0,8646354 - 0,1795032 (1/S)^2 - 0,2769380 (T)^2 - 0,2964249 (\text{pH})^2$$

L'application du modèle en mode continu a également montré de faibles interactions entre les paramètres d'études avec un coefficient de détermination multiple de 0,835 satisfaisant mais plus faible que celui obtenu en mode discontinu ($R^2 = 0,975$). Il semblerait que la contribution du paramètre substrat est faible relativement aux autres paramètres. L'effet d'inhibition par le substrat éliminé en mode continu induit une forte influence de celui-ci sur la réaction enzymatique.

Le modèle est présenté par l'équation :

$$Y = 0,3832097 - 0,0606033(1/S)^2 - 0,0287155 (U)^2 - 0,1403227(T)^2 - 0,0546353(\text{pH})^2$$

Il apparaît donc que la forme polynôme de degré 2 compatible avec la présence d'un extremum est bien apte à prédire avec une très bonne approximation le phénomène enzymatique en discontinu et, avec une moindre précision le procédé en mode continu.

Annexes

Annexe1 : Dosage des protéines par la méthode de KJELDAHL

Le pourcentage de protéine est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ protéines} = \% \text{ d'azote total} \cdot 6,25$$

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

1-Minéralisation :

- On ajoute à 2g d'échantillon, 10ml de H₂SO₄ concentré ; chauffer jusqu'à décoloration ; poursuivre le chauffage pendant 2 heures.

2-Distillation :

- Placer l'extrémité du condensateur dans un erlen de 250ml d'acide borique à 40% et quelques gouttes du réactif de THOSHIRO ;
- Verser le contenu du matra dans le réservoir de distillation, ajouter quelques gouttes de phénolphtaleine ;
- 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 syphon ;
- Ouvrir le robinet de vapeur et distiller pendant 5 minutes ; enlever l'erlen et rincer l'extrémité du réfrigérant.

3-Titrage :

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

$$\% \text{ d'azote total} = d \cdot V_a \cdot 0,28 / (m_e \cdot 1000) \cdot 100$$

Avec V_a : Volume d'acide ajouté (ml)

M_e : Masse de la prise d'essai

d : Densité de l'échantillon à doser

Annexe 2 : Dosage colorimétrique des protéines « Biuret »

❖ Principe :

En milieu alcalin, les composés contenant au moins deux groupements -CO-NH_2 ou -CO-NH- voisins forment avec les ions cuivriques (Cu^{2+}) un complexe bleu-violet. Cette coloration se développe en particulier avec le Biuret, $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$ d'où son appellation de coloration de Biuret.

L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques. Il en résulte que pour une protéine pure, l'intensité est proportionnelle à la concentration de celle-ci. Cette concentration ne doit pas excéder 10mg/l.

❖ Préparation du réactif de Cornall

- Dissoudre 1,5g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 250ml d'eau distillée
- Dissoudre 6,0g de tartrate double de Na et K dans 250 ml.
- Dissoudre 30g de NaOH dans 300ml d'eau distillée.
- Faire le mélange de ces trois solutions et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

❖ Mode opératoire :

1. A partir du sérum étalon dont le titre en protéines est connu, réaliser les dilutions suivantes : $1/10^{\text{ème}}$; $1/20^{\text{ème}}$; $1/40^{\text{ème}}$; $1/80^{\text{ème}}$ avec de l'eau physiologique
2. Introduire dans une série de tubes à essai (1, 2, 3 et 4) :1ml de chacune des dilutions et 4ml de réactif de Cornall
3. Mélanger et attendre 3 minutes à température ambiante à l'obscurité.
4. La coloration est stable, lire l'absorbance de chaque tube à 540nm.

Annexe 3 : Détermination de la teneur en matière grasse libre.

❖ **Définition:** On entend par matière grasse libres des viandes et produits à base de viande, la matière grasse extraite selon la technique décrite dans la présente norme.

La teneur en matière grasse libre s'exprime en pourcentage en masse.

❖ **Principe :** Extraction de l'échantillon séché, par du n-hexane technique ou de l'éther de pétrole. Elimination du solvant par évaporation, séchage du résidu puis pesé après refroidissement.

❖ **Mode opératoire :**

– **Préparation de l'échantillon :** Broyer et mélanger un échantillon représentatif de 200g au minimum par 2 broyages dans le hachoir, remplir un flacon étanche avec l'échantillon et conserver celui-ci de façon à éviter sa détérioration et un changement dans sa composition.

Analyser l'échantillon aussi vite que possible, mais toujours avant les 24 heures.

– **Prise d'essai :** Utiliser le résidu de la détermination de l'humidité. Dans le cas où la détermination de l'humidité n'est pas nécessaire, prélever 3 à 5g de l'échantillon et sécher avec une quantité de sulfate de sodium anhydre telle que la matière se détache facilement du récipient dans lequel est faite la trituration (de l'ordre de 30 à 40g)

– **Détermination :**

Sécher pendant une heure à l'étuve réglée à 105°C la fiole de l'appareil d'extraction contenant les régularisateurs d'ébullition. Laisser refroidir la fiole jusqu'à température ambiante dans le dessiccateur, et peser à 1mg près : soit M_0 cette masse

Transvaser quantitativement la prise d'essai dans la cartouche d'extraction. Enlever les dernières traces de la prise d'essai séchée de la capsule en utilisant du coton humidifié avec le solvant d'extraction et en mettant également celui-ci dans la cartouche.

Placer la cartouche dans l'appareil d'extraction, verser dans le matras de l'appareil d'extraction un volume de solvant d'extraction égale à 1,5 à 2 fois la capacité du tube inférieur de l'appareil. Ajouter la fiole à l'appareil d'extraction, chauffer la fiole au bain-marie stable pendant quelques heures selon la vitesse d'extraction et l'appareil utilisé (6 à 8 heures). Après extraction, prendre le matras contenant le liquide provenant de l'extraction et éliminer par distillation le solvant, en utilisant le bain-marie.

Evaporer les dernières traces du solvant au bain-marie en utilisant si nécessaire un courant d'air.

Sécher la fiole pendant une heure à l'étuve à 105°C, et après refroidissement à la température ambiante dans le dessiccateur, peser à 1mg près, soit M_1 cette masse.

– **Expression du résultat :**

$$\text{Matière grasse libre(\%)} = [(M_1 - M_0) \times 100] / E$$

E : Masse de la prise d'essai

M_0 : Masse de la fiole et des régularisateur d'ébullition.

M_1 : Masse de la fiole, des régularisateur et de la masse grasse après séchage.