

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

1/95

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT DE GENIE ENVIRONNEMENT

الدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

**PROJET DE FIN D'ETUDES**

SUJET

CARACTERISATION ET TRAITEMENT  
D'UN REJET D'HUILERIE

*" Le grignon d'olive "*

Proposé par :  
Dr. D. MAMERI

Etudié par :  
Amel BAKALEM

Dirigé par :  
Dr D. MAMERI  
M<sup>me</sup>. F. Halet.

PROMOTION  
JUILLET 1995

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT DE GENIE ENVIRONNEMENT

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

**PROJET DE FIN D'ETUDES**

SUJET

**CARACTERISATION ET TRAITEMENT  
D'UN REJET D'HUILERIE  
" Le grignon d'olive "**

**Proposé par :**  
Dr. D. MAMERI

**Etudié par :**  
Amel BAKALEM

**Dirigé par :**  
Dr D. MAMERI

**PROMOTION  
JUILLET 1995**

# Dédicaces



**A** mes très chers parents pour tous les sacrifices

qu'ils ont consenties pour moi et l'intérêt

qu'ils n'ont cessé de porter à mes études

Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude

**A** mes chers frères Mohamed et Mehdi

**A** mes chères soeurs Souhila, Nabila, Mouna, et Nadjila.

**A** mon beau frère Mohamed

**A** mon adorable neveu Riadh

**A** tous mes amis (es)

**Je** dédie ce modeste travail en témoignage de mon affection et mon  
amour

## REMERCIEMENTS



Ce travail a été réalisé au Laboratoire des Biotechnologies du département de génie de l'Environnement de l'Ecole Nationale polytechnique d'Alger dirigé par D. Mameri.

Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour sa disponibilité et son aide précieux

Je remercie chaleureusement Mme Halet post-graduante à l'ENP pour m'avoir fait bénéficier de son savoir et m'avoir apporté sans compter aide et soutien. Il m'est impossible en ces quelques lignes d'exprimer mes remerciements et ma reconnaissance

Je tiens à remercier les membres du jury

- Mr Namane                      Président du Jury
- Mme Cherid                      Examinatrice
- Mlle Haddoud                      Examinatrice
- Mme Abdi                      Examinatrice
- Mme Halet                      Invité

J'exprime ma gratitude à Mr Halet, post graduant à l'ENP pour l'énorme effort qu'il a fourni et l'immense intérêt qu'il apporté à mon travail.

Je remercie vivement Mrs H. Lounici et Ghrib pour l'aide qu'ils m'ont apporté à mon travail

Je tiens à remercier tous les étudiants de 4ième Année de Génie de l'Environnement et plus particulièrement Amel, Mounia, Farida, Amel , Dalila

Yacine et Mourad pour l'aide qu'ils m'ont apporté et pour leurs encouragements et soutien.

De très profonds remerciements sont réservés à Mlle L.Fenniche et Mr N. Benhamour pour leur aide et sympathie ainsi qu'à tous mes collègues de la promotion.

Enfin , j'exprime toute ma reconnaissance et gratitude à toute les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ma formation .

## Abréviations

|                |                          |
|----------------|--------------------------|
| M.S.           | Matière sèche            |
| C.T.           | Cendres totales          |
| M.A.T.         | Matières azotées totales |
| M.G.           | Matières grasses         |
| C.B.           | Cellulose brute          |
| N.D.F.         | Neutral detergent fiber  |
| A.D.F.         | Acid detergent fiber     |
| A.D.L          | Acid detergent lignine   |
| S.T.           | Sucres totaux            |
| Ca             | Calcium                  |
| Na             | Sodium                   |
| K              | Potassium                |
| m <sup>3</sup> | mètre au cube            |
| Kg             | Kilogramme               |
| l              | Litre                    |
| μl             | microlitre               |
| E              | Enzyme.                  |
| S              | Substrat.                |

# SOMMAIRE

## I INTRODUCTION

## II ETUDE THEORIQUE

### II.1 Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier

- II.1.1 La production oléicole
- II.1.2 Composition de l'olive
- II.1.3 Définition des sous produits de l'oléiculture
- II.1.4 Composition chimique du grignon d'olive
- II.1.5 Estimation quantitative des rejets d'huilerie et impact sur l'environnement
- II.1.6 Valorisation des sous produits de l'oléiculture

### II.2 Les résidus ligno-cellulosique Composition, structure propriétés

- II.2.1 La cellulose
- II.2.2 Les hémicellulose
- II.2.3 La lignine

### II.3 Les enzymes

- II.3.1 Définition

- II.3.2 Classification des enzymes
- II.3.3 Phénomène en jeu dans un cycle catalytique
- II.3.4 Cinétique enzymatique
  - II.3.4.1 Théorie de Michaelis et Menten
  - II.3.4.2 Facteurs physiques et physico-chimiques affectant l'hydrolyse enzymatique

## II.4 Hydrolyse enzymatique des résidus lignocellulosiques

- II.4.1 Prétraitements
  - II.4.1.1 Prétraitements physiques
  - II.4.1.2 prétraitements chimiques
  - II.4.1.3 Prétraitements biologiques
- II.4.2 Hydrolyse enzymatique
  - II.4.2.1 Le système enzymatique
  - II.4.2.2 Régulation enzymatique
  - II.4.2.3 Effet de la cellulose sur l'hydrolyse enzymatique
  - II.4.2.4 Effet de la lignine sur l'hydrolyse enzymatique
  - II.4.2.5 Cinétique de l'hydrolyse enzymatique
- II.4.3 Hydrolyse acide

## II.5 Les réacteurs

- II.5.1 Classification des réacteurs
- II.5.2 Formulation générale du bilan de matière pour un réacteur fermé

### III ETUDE EXPERIMENTALE

#### III.1 Matériels et méthodes

- III.1.1 Origine de l'échantillon
- III.1.2 Préparation du substrat expérimental
- III.1.3 Détermination des principales caractéristiques du substrat expérimental
- III.1.4 Prétraitement chimique
  - III.1.4.1 Effet des paramètres physico chimiques sur le prétraitement à la soude caustique sur la composition chimique
  - III.1.4.2 Influence du prétraitement à la soude caustique sur la composition chimique
- III.1.5 Hydrolyse enzymatique
- III.1.6 Hydrolyse acide

#### III.2. Résultats expérimentaux

- III.2.1 Principales caractéristiques chimiques du substrat
- III.2.2 Prétraitement chimique
  - III.2.2.1 Effet des paramètres physico-chimiques sur le prétraitement à la soude
    - III.2.2.1.1 Effet du taux de soude
    - III.2.2.1.2 Effet de la température
    - III.2.2.1.3 Effet de la durée de traitement
  - III.2.2.2 Influence du prétraitement à la soude sur la composition chimique du substrat.

III.2.3 Cinétique de l'hydrolyse enzymatique .

III.2.4 Cinétique de l'hydrolyse acide

#### IV CONCLUSION

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

# INTRODUCTION

## Introduction

La diminution des ressources en fuels fossils et la croissance de leur demande ont mené à la recherche d'une ressource d'énergie alternative. La biomasse ligno-cellulosique, constituée par des résidus agricoles (pailles de céréales, tiges de maïs), certains sous produits de l'industrie agro-alimentaire (pulpes, bagasse, grignon d'olive) les fourrages et bois non exploités pour son abondance et sa ~~renouvelabilité~~ elle peut constituer une matière première énergétique intéressante.

La cellulose constituant majeur de la biomasse ligno-cellulosique, peut être valorisée en tant que polymère dans l'industrie des dérivées de la cellulose ou bien, après hydrolyse par voie chimique ou enzymatique, fournir du glucose qui constitue une matière première importante pour l'industrie chimique. Les produits ligno-cellulosiques peuvent <sup>être</sup> utilisés par combustion directe, mais également par fermentation de la fraction glucosidique en éthanol.

En Algérie, pour des raisons techniques et surtout économiques, la biomasse ligno-cellulosique, mis à part son utilisation dans l'alimentation des ruminants, ne fait l'objet d'aucune valorisation. Néanmoins certains travaux [6] [23] ont été effectuées à l'échelle laboratoire et même pilote permettant de valoriser cette réserve importante.

Le but de notre travail consiste à mettre en oeuvre un procédé de valorisation d'un matériel ligno-cellulosique « le grignon d'olive » par hydrolyse chimique et enzymatique à l'échelle laboratoire.

De ce fait , la première étape de notre travail sera consacrée à une étude théorique sur les problèmes relatifs à l'hydrolyse des polysaccharides par des produits chimiques ( acides et bases ) et biologiques (enzymes ) .

La deuxième étape est consacrée à la détermination des principales caractéristiques du substrat expérimental .

La troisième étape sera consacrée à la détermination des paramètres optimaux pour le pré-traitement alcalin à la soude caustique .

La quatrième partie , est une étude comparative des deux voies suivantes :

La première biologique : consiste en une hydrolyse enzymatique du grignon d'olive pré-traité à la soude caustique .

La seconde chimique : consiste en hydrolyse chimique à l'acide sulfurique du grignon d'olive .

## II ETUDE THEORIQUE:

### II.1 Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier

#### II.1.1 La production oléicole

La culture de l'olivier est très ancienne, son histoire se confond avec celle du bassin méditerranéen. Bien que son aire de répartition ne cesse de s'élargir, l'olivier reste cependant une culture méditerranéenne par excellence, avec un taux de 97% de la production totale d'olivier (tableau 1.1).

L'Algérie, un des pays producteurs de l'huile d'olive, compte actuellement 16 millions d'oliviers sur une surface d'environ 197.000 hectares. Les variétés rencontrées sont principalement: la **Chemlal** (50 %), l'**Azeradg** (5 %), la **Bouchouk** et la **Limli** (2 %) cultivées surtout en **Kabylie** et la **Sigoise** (20 %/) à l'**Oranie**. A coté de ces variétés locales, on rencontre aussi des variétés introduites d'Espagne, de France et d'Italie comme la **Cornicobra**, la **Lucques** et la **Frantoïo**. [6]

#### II.1.2 Composition de l'olive :

L'olivier est une drupe, sa composition physique est indiquée à la figure 1.1

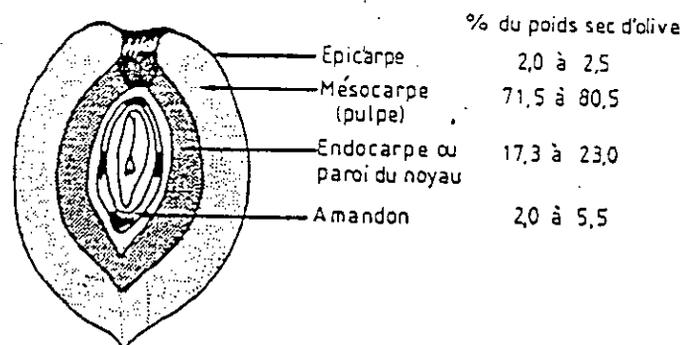


Figure 1.1 Composition physique de l'olive [4]

La composition chimique de l'olive est fonction de plusieurs paramètres, dont la variété, le climat et les conditions culturales. La composition chimique moyenne de l'olive en fonction des différentes parties anatomiques est indiquée dans le tableau 1.2

**Tab.1.1: Répartition des Oliviers par Pays [6]**

| Pays      | Arbres<br>x 10 <sup>3</sup> | %    | Surface en<br>ha x 10 <sup>3</sup> | %    | Densité<br>Arbre/ha |
|-----------|-----------------------------|------|------------------------------------|------|---------------------|
| Algérie   | 15.818                      | 2.0  | 197                                | 2.2  | 80                  |
| Espagne   | 207.726                     | 26.6 | 2.415                              | 26.9 | 86                  |
| France    | 5.766                       | /    | 42                                 | /    | 137                 |
| Maroc     | 28.000                      | 3.6  | 150                                | 2.7  | 112                 |
| Tunisie   | 52.936                      | 6.8  | 1363                               | 15.1 | 39                  |
| USA       | 4.500                       | /    | 44                                 | /    | 102                 |
| Argentine | 8.270                       | 1.0  | 84                                 | 0.9  | 92                  |
| Syrie     | 19.315                      | 2.5  | 146                                | 1.6  | 132                 |
| Grèce     | 95.936                      | 12.3 | 504                                | 5.6  | 190                 |

**Tab.1.2: Composition chimique de l'Olive mure [4]**

| Partie anatomique<br>Constituant | Epicarpe | Mésocarpe | Endocarpe +<br>Armandon |
|----------------------------------|----------|-----------|-------------------------|
| Cendres totales                  | 1.6      | 2.3       | 1.2                     |
| Matières azotées                 | 9.8      | 9.6       | 1.3                     |
| Matière grasses                  | 3.4      | 51.8      | 0.8                     |
| Cellulose brute                  | 2.4      | 12.0      | 74.1                    |
| Extractifs non azoté             | 82.8     | 24.2      | 22.7                    |

### II.1.3 Définition des sous produits de l'Oleiculture:

La technologie d'extraction de l'huile d'olive est très variable. Les deux procédés actuellement utilisés sont la pression et la centrifugation. Il existe d'autres procédés, comme le procédé *Acapulco* qui comprend la séparation préalable du noyau et de la pulpe avant extraction de l'huile. Une multitude de sous produits en résulte. On distingue:

**Le grignon Brut :** c'est le résidu de la première extraction de l'huile par pression de l'olive entière, il contient des teneurs élevées en eau (24%) et en huile (9%) ce qui favorise son altération rapide lorsqu'il est laissé à l'air libre.

**Le Grignon épuisé:** c'est le résidu obtenu après déshuilage ou épuisement du grignon brut par un solvant (généralement l'hexane).

**Le Grignon tamisé:** (ou partiellement dénoyauté): il résulte de la séparation partielle des débris de coque et de la pulpe par tamisage ou ventilation. Il est dit "gras" si son huile n'est pas extraite par solvant, et "dégraissé" ou "épuisé" si son huile est extraite par solvant.

**La pulpe d'olive:** c'est la pâte obtenue lorsque le noyau a été séparé de l'olive avant l'extraction de l'huile. (procédé *Acapulco*). Elle est riche en eau (60%) et de conservation très difficile.

**Les Margines:** c'est un résidu aqueux, séparé de l'huile par centrifugation ou sédimentation après le pressage. Il représente 50% du poids de l'olive [4].

Les quantités produites de ces sous-produits sont fonction du procédé d'extraction de l'huile.

#### **II.1.4: La composition chimique du grignon d'olive:**

La composition chimique du grignon d'olive varie dans de large limites, en fonction de l'olive elle même (état de maturité ,variété ,etc...) et du procédé d'extraction de l'huile.

##### **a) Teneur en matière sèche :**

Elle varie selon le type de grignon. DEMAY (1956), cité par ABDOULI (1978) signale que la presse hydraulique et la super presse laissent un grignon à 25 % d'humidité contre 60 % pour la presse continue .

##### **b) Les matières minérales :**

Des teneurs en cendres 4 a 5 fois plus importantes que celles considérées comme une moyenne (5 % de la matière sèche) sont rapportées par certains auteurs. Cet excès est attribuée a une contamination par du sable au niveau des huileries. Le potassium et le calcium apparaissent comme éléments prédominants suivis du phosphore et du sodium.

##### **c) Les matières grasses:**

La teneur en matière grasse est le plus souvent élevée et demeure fonction du mode d'extraction de l'huile. La pression donne des grignons et des pulpes riches en M.G. (30 % de la M.S en moyenne). L'épuisement la réduit à 4-5% de la M.S ce qui explique l'intérêt de cette opération.

La matière grasse du grignon d'olive est riche en acide oléique, linoléique, palmitique et linolénique. Les proportions en chacun de ces acides gras différents en fonction de l'origine de l'olive et du traitement appliqué.

La richesse du grignon en lipides pose un problème de conservation de ce résidu. En effet, des phénomènes de rancissement de graisse peuvent se produire.

#### **d) Les fibres brutes :**

La teneur en cellulose brute est également élevée et varie de 15 à 50% de la M.S. Elle dépend de la proportion de coques présente dans le résidu. Les coques de noyaux renferment 74% de fibres brutes contre 2.43% et 12.1% respectivement pour la pellicule et la pulpe.

La teneur en lignine est également élevée, (30% de la M.S).

#### **e) Les matières azotées totales:**

La teneur en protéines brutes est voisine de 10% de la M.S et varie (7 à 16%) en fonction de la proportion de coques de noyaux. Ces derniers représentent environ la moitié de la masse du grignon et renferment 1 à 2% de M.A.T. Ainsi, contrairement aux autres tourteaux, le grignon d'olive est pauvre en protéines brutes, ce qui témoigne d'une faible valeur biologique de ce résidu.

#### **f) Les composés phénoliques:**

Les phénols identifiés dans le grignon d'olive sont surtout: *l'oleuropeine*, la *caffeyl-glucose*, l'*acide coumarique* et le *flavanol*. [28]

Les teneurs moyennes des différents types de grignons en cendres totales (CT), en matières grasses (MG), en cellulose brute (CB), et en extractif non azoté (ENA) sont représentés au tableau 1.3.

**Tab. 1.3 : Composition chimique des différents types de grignons en % de la M.S [4]**

| Types de Grignons | Brut | Epuisé | Tamisé | Epuisé-tamisé |
|-------------------|------|--------|--------|---------------|
| M.S               | 81.4 | 89.0   | 92.8   | 89.5          |
| C.T               | 8.0  | 7.9    | 17.3   | 15.5          |
| M.A.T             | 6.6  | 13.6   | 7.3    | 10.3          |
| M.G               | 12.9 | 3.2    | 18     | 4.0           |
| C.B               | 35.5 | 40.7   | 24.2   | 21.5          |
| E.N.A             | 37.0 | 34.6   | 33.2   | 48.7          |

#### II.1.5: Estimation quantitative des rejets d'huilerie et impact sur l'environnement:

Le procédé classique d'extraction d'huile d'olive par pression, produit en moyenne, pour une quantité de 100Kg d'olive:20Kg d'huile, 40Kg de grignon, et 40Kg de margines [14].

Dans la région de Kabylie, la principale région productrice de l'huile en Algérie, les rejets solides et liquides des huileries sont estimés en tonnage et en volume à 48.000 Tonnes de grignons et 48.000 m<sup>3</sup> d'eau de végétation (margine) rejetés directement dans la nature, ces produits occasionnent de graves détérioration à l'environnement. En effet, les eaux de végétation et par simple infiltration contaminent les eaux souterraines. Elles peuvent également former des cours d'eau contenant une forte charge polluante, qui rendent difficile le développement de la faune et de la flore [20].

## **II.1.6 Valorisation des sous produits de l'Oleiculture**

Les grignons d'olives, les coques et les eaux de végétation, pour leurs quantités très importantes, et leurs effets défavorables sur l'environnement, ont fait l'objet de valorisation, afin d'être utilisés à des fins industriels. (tableau 1.4)

### **a) valorisation des coques:**

La forte valeur énergétique des coques issues du décorticage permet leur utilisation comme combustible, assurant ainsi la couverture, énergétiques des huileries, voire des savonneries qui y sont souvent jointes. Les cendres peuvent servir d'engrais en raison surtout de leur teneur en oxyde de potassium [8] [12].

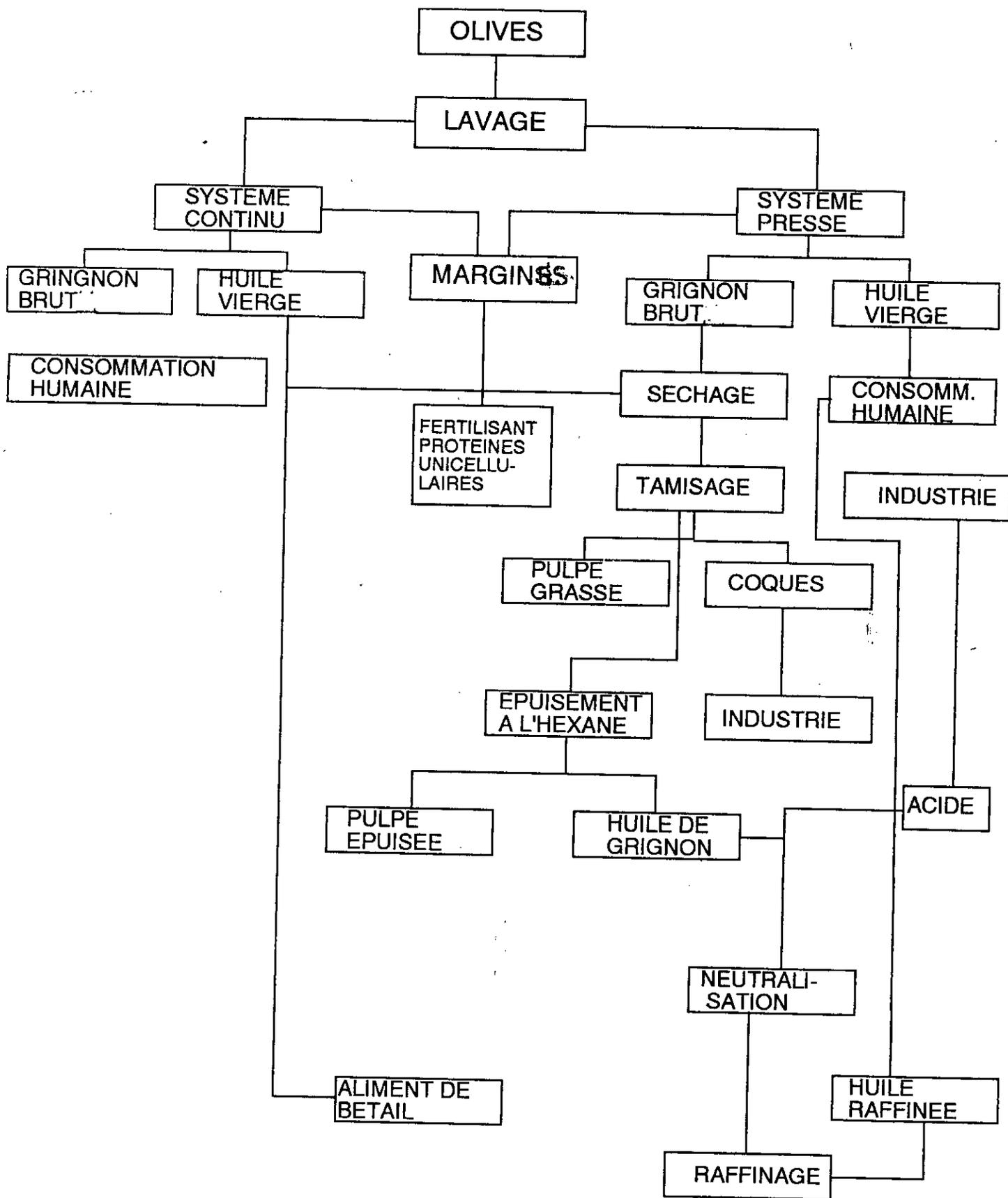
### **b) Valorisation des grignons:**

Les grignons d'olives mélangés à des fourrages sont utilisés comme aliment pour le bétail. Ils sont également utilisés dans la production continue du furfural, et dans la production d'alcool par saccharification, toutefois il faut noter que ces procédés ne semblent pas être avantageux sur le plan économique. Les recherches se poursuivent dans le but d'amélioration.

Aux U.S.A., les grignons d'olives sont principalement utilisés pour le nettoyage de certaines surfaces métalliques, par sablage [8] [20].

### **c) Valorisation des eaux de végétation:**

L'étude des méthodes visant à l'utilisation industrielle des eaux de végétation qui en prévoit aussi la séparation, apparaît assez souhaitable. Outre leur emploi comme engrais liquide, fertilisant et compost, on a découvert en Espagne, une méthode intéressante qui consiste à exploiter les eaux de végétation en extrayant des



**TABLEUA 1 - 4 : Valorisation des produits de l'olive (12)**

levures de type "*Candida*" qui permettent l'épuration des eaux. La teneur en sucre, facilement assimilable des eaux de végétation, les sels minéraux et un pH excellent en font un champ idéal pour le développement de ces levures [8] [12] [14] .

## II.2: Les résidus ligno- cellulosiques: Composition-Structure-Propriétés :

La biomasse ligno-cellulosique est constituée essentiellement par les parois végétales des plantes récoltées. L'anatomie de la paroi végétale est bien connue (figure 2.1). Cette paroi végétale<sup>est</sup> constituée de différentes couches successives dont les propriétés physico-chimiques et mécaniques s'intègrent pour donner à la paroi sa spécificité fonctionnelle .

Chimiquement, les parois végétales contiennent trois constituants principaux: cellulose, hémicelluloses et lignine.

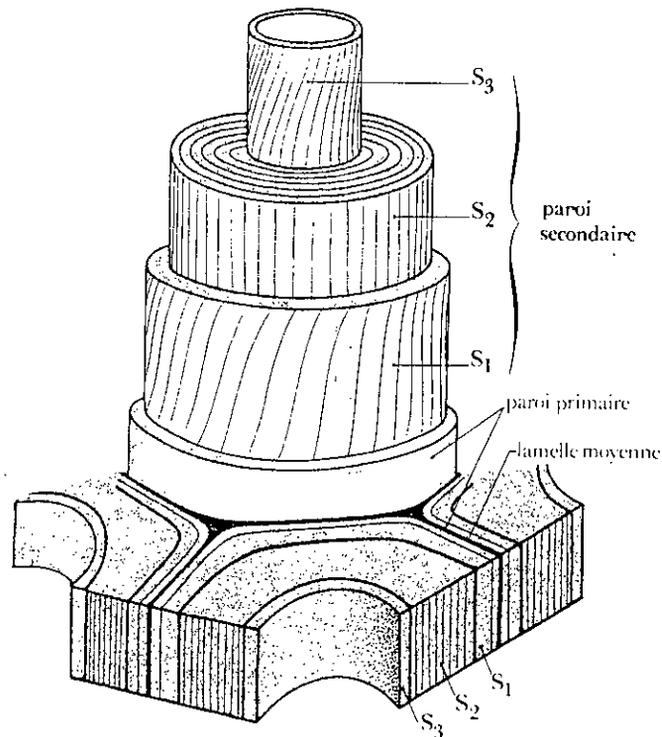


Fig. 2.1 Structure de la paroi végétale [1] .

### II.2.1: La cellulose:

La cellulose est un biopolymère de nature fibrillaire, synthétisée dans le cytoplasme des cellules végétales, et est déposée à l'extérieur de la membrane plasmique participant ainsi au maintien de la rigidité des tissus [3].

La cellulose est un polysaccharide de la série B-D glucanes. C'est une macromolécule linéaire constituée d'unités anhydroglucose liées entre elles par des liaisons glucosidiques du type B.1-4, sous la configuration chaise (figure 2.2). Son degré de polymérisation est de l'ordre de 10.000 unités par molécules. Elle est insoluble dans l'eau mais soluble dans la liqueur de Schweitzer [2] [24].

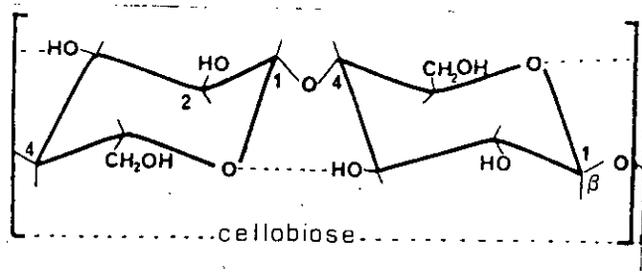
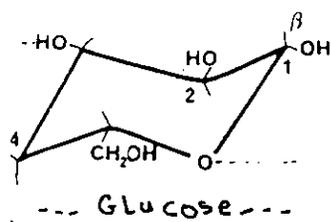
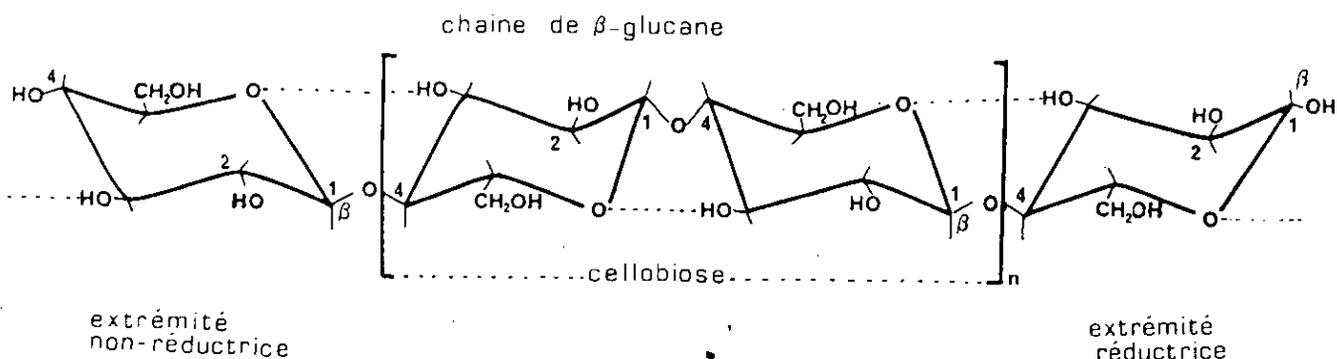


Figure 2.2.a: Structure chimique du Cellobiose et du Glucose.



**Fig.2.2.b** *Fragment d'une chaîne de cellulose* [2]

Par la nature de son monomère, le glucose, c'est l'hydrolyse de la cellulose qui constitue l'objectif essentiel de tout procédé d'hydrolyse des biomasses lignocellulosique .[1]

## II.2.2 Les Hemicelluloses:

Le nom d'hemicellulose est donné pour désigner tous les polysaccharides des plantes autres que l'amidon, la cellulose et les matières pectiques. Il regroupe par conséquent des polysaccarides de composition très diverses.

Les hemicelluloses sont des polysaccarides, courts, branchés et facilement hydrolysables. Ils existent sous forme d'homopolysaccharides comme les  $\beta$ -glucanes, mais plus souvent sous forme d'hétéro-polysaccharides comme le L-Arabino-D-Glucurono-D-Xylane.

Les hemicelluloses sont insolubles dans l'eau, dans les solvants organiques et dans la liqueur de Schweitzer, et sont solubles dans les bases diluées (soude, potasse). Leur hydrolyse fournit essentiellement des pentoses [1] [3].

### II.2.3 La lignine:

Les lignines sont des polymères tridimensionnels d'origine phénolique, formées par la copolymérisation de 3 alcools phenyl-propanoïques:

l'alcool coumarilique, l'alcool coniferylique et l'alcool sinapylique (figure 2.3) [10].

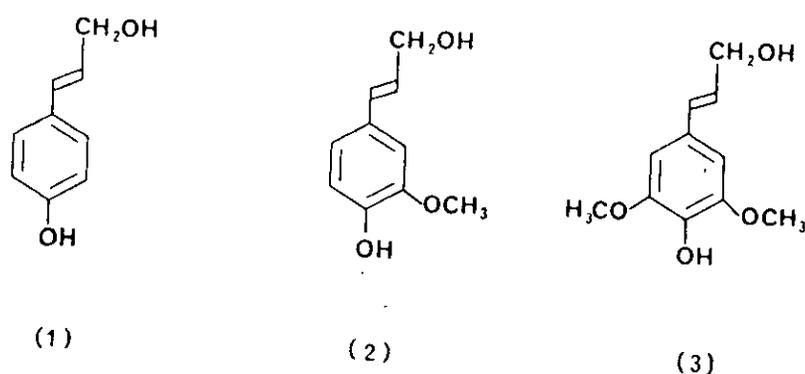


Fig.2.3: Configuration des alcools phenyl-propanoïques .

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

Les liaisons qui relient les unités monomériques sont extrêmement variées, il s'agit dans tous les cas de liaisons stables, et non hydrolysables. Reste à noter que les lignines sont rapidement attaquées par les chlores, les hypochlorites et d'autres oxydants tels que l'acide azotique, l'acide chromique et le permanganate de potassium [10].

## **II.3 LES ENZYMES :**

### **II.3.1 Définition :**

Une enzyme est un catalyseur biologique de nature protéique complexe assurant spécifiquement la transformation d'un substrat ou d'une classe de substrats [10].

### **II.3.2 Classification des enzymes :**

Les enzymes sont officiellement classées par la commission internationale de nomenclature des enzymes, selon la nature des réactions, en 6 groupes:

#### **Les oxydo-reductases:**

Catalysent les réactions d'oxydoréduction, quelque soit le mécanisme.

#### **Les transférases:**

Catalysent les réactions de transfert de radicaux fonctionnels d'une molécule à l'autre .

### **Les hydrolases:**

Catalysent la rupture d'une liaison par fixation d'une molécule d'eau. c'est la classe qui contient la plupart des enzymes utilisées en industrie .

### **Les liases:**

Catalysent des réactions qui permettent les déplacements d'un groupement sur le substrat avec apparition d'une double liaison.

### **Les isomerase:**

Catalysent les réactions du type  $A \rightleftharpoons B$

### **les lipases :**

Catalysent l'union de deux molécules en utilisant l'énergie fournie par la dégradation de l'A.T.P [2] .

#### **3.2.1: Les cellulases:**

Se sont des enzymes qui appartiennent à la classe des hydrolases, elles dégradent la cellulose en glucose.

Les principales sources de celluloses sont représentées au tableau 2.1

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'enzyme cellulolytique sécrétée par le champignon de pourriture blanche: le "*Trichoderma-reesei*"

Le *Trichoderma-reesei* est un ascomycète qui représente l'avantage d'excréter en grandes quantités le mélange adéquat d'enzymes permettant l'hydrolyse aussi bien de la cellulose que des hemicelluloses et des lignines. Il est compté parmi les sources principales des préparations commerciales de celluloses.

| Fungi                         | Bactérie                         |
|-------------------------------|----------------------------------|
| - Trichoderma Viride          | - Micromonospora ruminantium     |
| - Tricoderma Koningii         | - Ruminococcus albus             |
| - Trichoderma reesei          | - Ruminococcus flave facieus     |
| - Chaetonium indicum          | - Bactériode ruminantium         |
| - Chatoenium Cellulotium      | - Clostridium cellobiomorus      |
| - Murothecium Verrucaria      | - Clostridium thermocellulassium |
| - Aspergillus niger           | - Bacillus Subtilus              |
| - Rhizopus stolonifer         | - Arthrobacter luteus            |
| - Sporotrichum ThermopHile    | - Micro polyspora                |
| - Sporotrichum Pulverichentum | - Clostridium Themocellum        |
| - Penecillium rubrum          | - Cellulomonas U.D.A             |
| - Penecillium janthinellum    | - cellvibrio fulvus              |
| - Polyponus versicolor        | - Cellabrio gibvus               |
| - Basidiomycetes opécies      | - SporocytopHaga mycoccoides     |
| - Helmuntos poinum cylops     | - Actinomyces sp.                |
| - Fusarium solani             | - Proactinomyces sp.             |
| - Fusarium oxysporum          | - Nocardia sp.                   |
| - Stachybotys atra            |                                  |
| - Talaromyces emersonu        |                                  |
| - SchizopHylum commune        |                                  |
| - thermonos pora curvata      |                                  |

**Tableau 2.1. Les micro-organismes sources importantes de cellulases.**

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

Les surnageants de culture de tels champignons contiennent des endo-glucanases des exo-glucanases et des B-gluconisades [2] Ce système enzymatique sera présenté en détail dans le chapitre II . 4 .2 .

### II 3.3 phénomène en jeu dans un cycle catalytique:

Quelque soit le type de réaction catalysée, un cycle catalyse enzymatique se déroule toujours en quatre étapes successives:

- La diffusion des réactifs dans le milieu;
- La reconnaissance spécifique enzyme - substrat.
- La catalyse elle-même par des mécanismes appropriés;
- L'expulsion des produits formés qui libère l'enzyme et la rend fonctionnelle pour un nouveau cycle catalytique[2].

C'est l'étape de reconnaissance spécifique qui constitue l'originalité des enzymes et leur confère efficacité et sélectivité par rapport aux catalyseurs organiques.

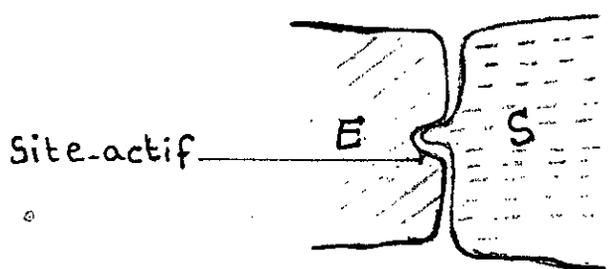
### II 3.4 cinétique enzymatique:

L'analyse cinétique des réactions enzymatiques consiste, par des mesures de vitesse, à déterminer les relations existantes entre la vitesse de la réaction enzymatique et les concentrations en substrat [s] et en enzyme [E] ainsi que l'influence de certains facteurs tels que: pH, température, présence d'inhibiteurs, etc....[24].

### II 3.4.1 Théorie de Michaelis et Menten:

La cinétique enzymatique, selon Michaelis et Menten, est basée, sur 3 hypothèses qui ont été vérifiées expérimentalement :

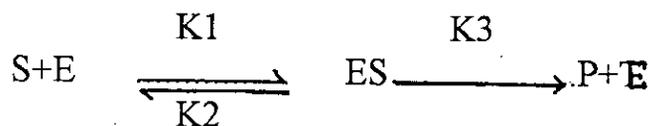
1) L'enzyme, pour exercer son pouvoir catalytique, forme avec le substrat une combinaison transitoire, la formation d'un tel complexe résulte de l'existence d'une affinité entre l'enzyme et le substrat. Cette affinité consiste en une complémentarité structurale stéréospécifique entre le substrat et un élément de surface de l'enzyme : le site-actif



2) Le complexe formé entre l'enzyme et le substrat est réversible .

3) La vitesse de la réaction enzymatique, c'est à dire la quantité de produits formés par unité de temps, est proportionnelle à la concentration du complexe [ES].

Soit le modèle simplifié d'une réaction enzymatique à un substrat et un complexe enzyme substrat



E: enzyme, S: substrat, ES: complexe enzyme-substrat,

P: produit de la réaction enzymatique

$k_1, k_2, k_3$  : constantes de vitesse.

En se basant sur ce schéma, la vitesse de la réaction exprimée par la relation de Michaelis et Menten est :

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

avec :  $V_{\max}$  : vitesse maximale.

$K_m$  : constante michaelis.

Le tracé de la courbe  $v = f([S])$  est représenté sur la figure 3.1

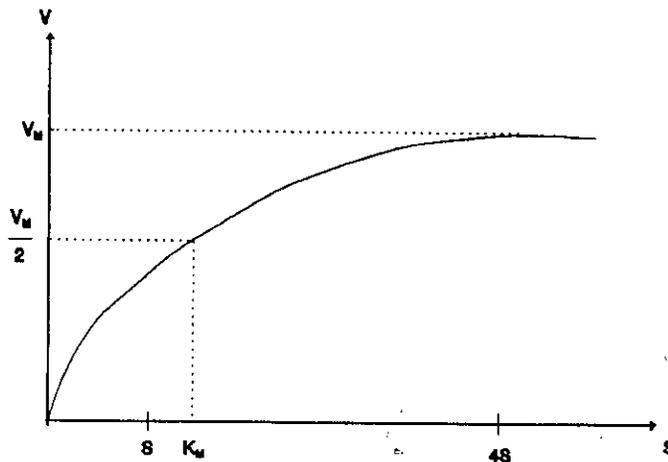


Fig 3.1: Représentation de  $v=f[S]$

### 1) Activité de l'enzyme "Vmax":

C'est la vitesse initiale d'une réaction enzymatique à concentration "saturante" de substrat.

$$V \longrightarrow V_{\max} \text{ quand } [S] \longrightarrow \infty$$

L'activité de l'enzyme est proportionnelle à sa concentration : mais pour une concentration d'enzyme donnée, elle varie avec la nature du substrat et dépend de la température et du pH.

## 2) Constante de Michaelis "K<sub>m</sub>"

Dans l'équation de Michaelis, K<sub>m</sub> est la quantité de substrat qui dans le milieu, permet à l'enzyme de procéder à la vitesse V<sub>max</sub> / 2. Elle est en fait la constante d'affinité.

K<sub>m</sub> est exprimé, en concentration de substrat (mole/l) [7]

### II 3.4.1.1 Détermination des paramètres K<sub>m</sub> et V<sub>max</sub>

La vitesse maximale V<sub>max</sub> et la constante de Michaelis k<sub>m</sub> sont extrapolés, à partir des transformations suivantes de l'équation de Michaelis (figure 3.2)

**Représentation de Eadie :**

$$V = V_{\max} - K_m \cdot \frac{V}{[S]} \quad (1)$$

**Représentation de Line Weaver et Burk:**

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (2)$$

- Représentation de Woolf:

$$\frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} [S] \quad (3)$$

Toutefois, la représentation de Line Weaver et Burk est la plus utilisée, car elle permet d'obtenir une linéarité apparente satisfaisante pour l'opérateur.

en effet :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]}$$

est l'équation d'une droite du type  $y = ax + b$ .

$$\text{avec } y = \frac{1}{V} \text{ et } x = \frac{1}{[S]};$$

$$\text{pour } \frac{1}{[S]} = 0 \text{ on a } \frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} \text{ et pour } \frac{1}{V} = 0 \text{ on a } \frac{1}{[S]} = \frac{1}{K_m}$$

il devient alors aisé de déterminer graphiquement  $1/V_{max}$  et  $1/K_m$  ; en outre, la pente de la droite

$$\text{est } \frac{K_m}{V_{max}} \quad [2] [9]$$

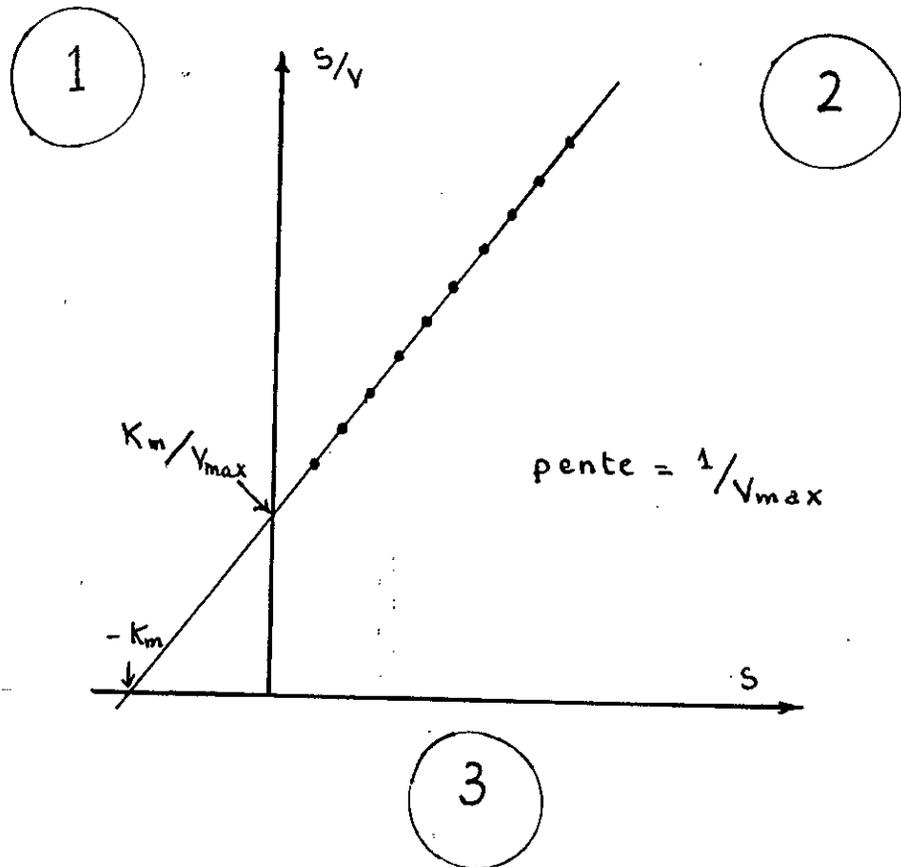
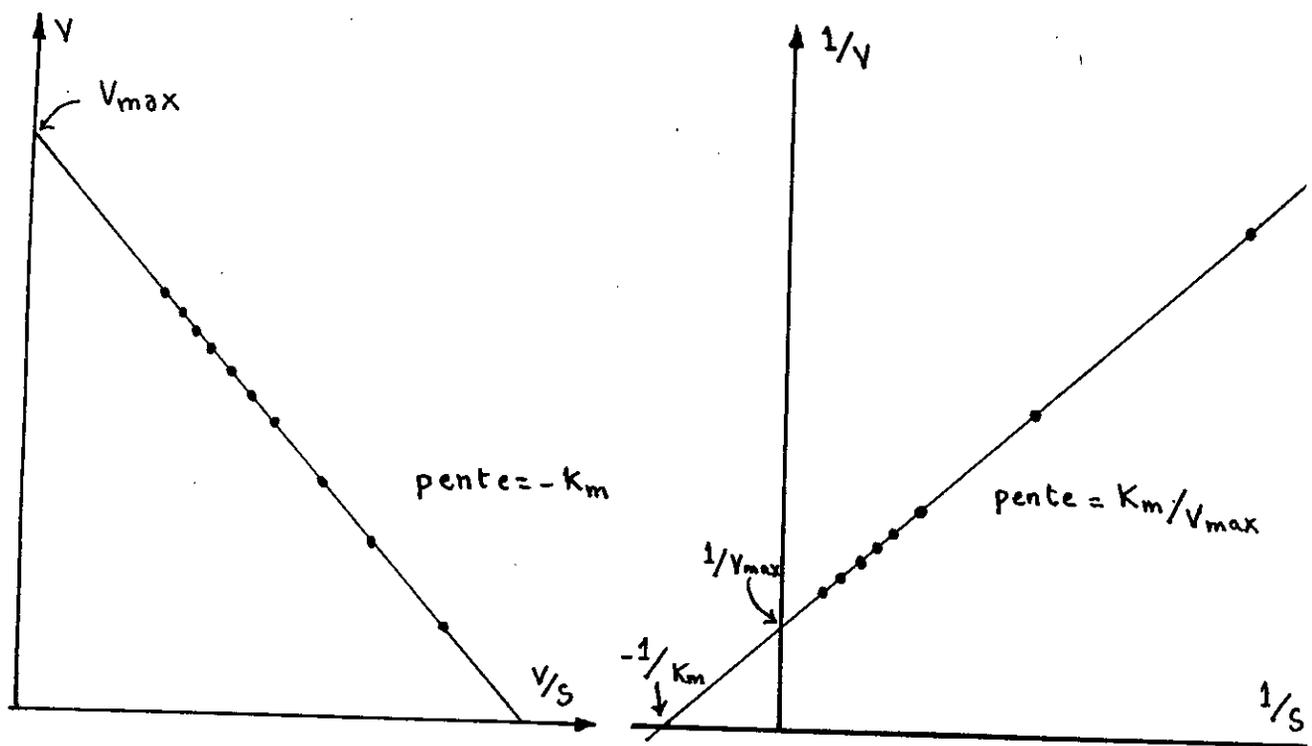


Fig 3.2  
 (1) *Représentation de Eadie*  
 (2) *Représentation de Line Weaver*  
 (3) *Représentation de Woolf [2]*

### II 3.4.1.2 :Variation de $P = f(t)$ :

Dans les conditions expérimentales définies de concentration<sup>en</sup> substrat et en enzyme, de température et de pH, le suivi de la réaction enzymatique est possible par le dosage régulier du produit  $P$  formé ,on obtient la courbe de la figure3.3.

Celle ci est d'abord rétiligne et les vitesses sont constantes . Elle s'infléchit ensuite pour atteindre un plateau, lorsque le substrat est totalement transformé, traduisant une diminution de la vitesse

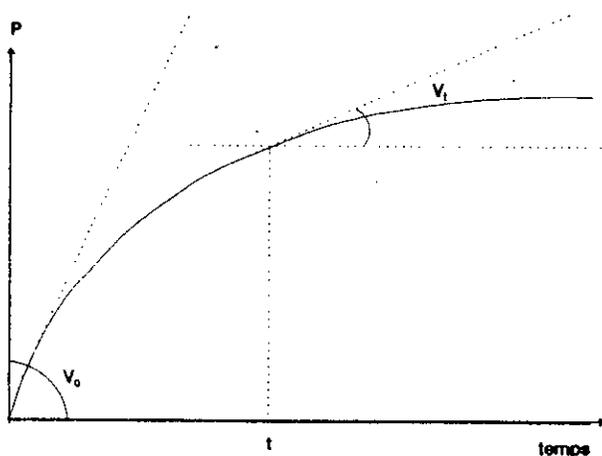


FIG 3.3 *Vitesse d'une réaction enzymatique* [9]

### II 3.4.1.3 : Variation de $V = f(E)$ :

L'équation des vitesses de réactions enzymatiques indique que ces réactions sont du premier ordre par rapport à la concentration d'enzyme, la vitesse est proportionnelle à  $E$ .

Or ceci n'est valable que si  $E \ll S_0$ . Si l'on suit expérimentalement les variations de la vitesse en fonction de la concentration d'enzyme, en faisant varier largement celle-ci, on observe une variation d'abord linéaire puis la courbe expérimentale s'incurve et atteint un palier.

Avant toute détermination des paramètres cinétiques, il est important d'étudier les variations de la vitesse en fonction de la concentration d'enzyme afin de choisir pour toute expérience ultérieure une concentration d'enzyme correspond à la partie linéaire de la courbe  $v = f(E)$ , l'équation de vitesse n'est applicable que dans ces conditions

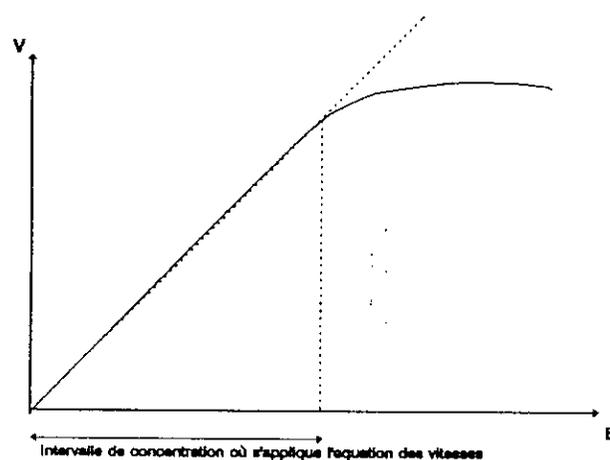


Fig 3.4 : Loi de variation de la vitesse avec la concentration d'enzyme [16]

En présence d'un excès de substrat la proportionnalité entre la vitesse de la réaction et la concentration d'enzyme est réalisée, . . .

## II 3.4.2 Facteurs physiques et physico-chimiques affectant la réaction enzymatique :

### II 3.4.2.1 La température :

La température influe fortement sur la réaction enzymatique. La vitesse de la réaction enzymatique augmente avec la température selon la loi d'Arrhénius. Cette augmentation est limitée , par l'action dénaturante de la température sur la protéine enzymatique. Une température optimale existe pour laquelle la stabilité et l'activité de l'enzyme sont maximales. Elle est un compromis entre les deux phénomènes: loi d'Arrhénius et dénaturation thermique .

sa valeur dépend de la durée, de la réaction enzymatique [5]

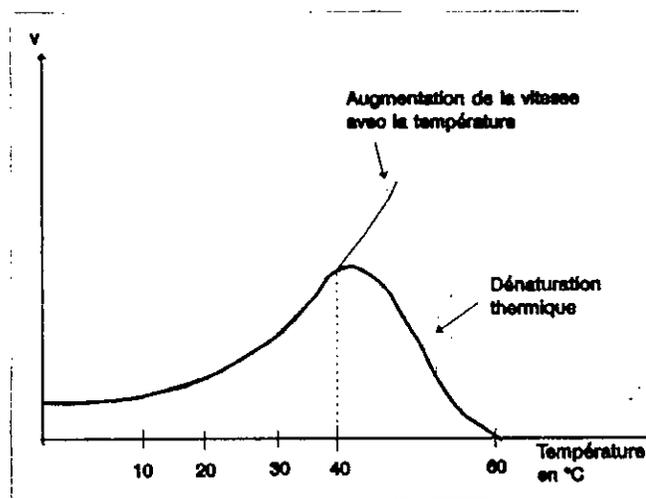


FIG 3.5 : *Variation de la vitesse d'une réaction enzymatique avec la température .*

### II 3.4.2.2 Action du pH :

L'activité d'une enzyme varie avec le pH, l'étude des variations de l'activité enzymatique en fonction du pH permet de constater l'existence de deux pH limites au delà des quels l'action est nulle. Entre ces deux pH ,l'activité présente un maximum a un pH bien définie ,dans ces conditions particuliers, dit pH optimal :figure 36 . La valeur du pH optimal dépend de la nature du substrat et de l'enzyme ainsi que de leurs concentrations [24]

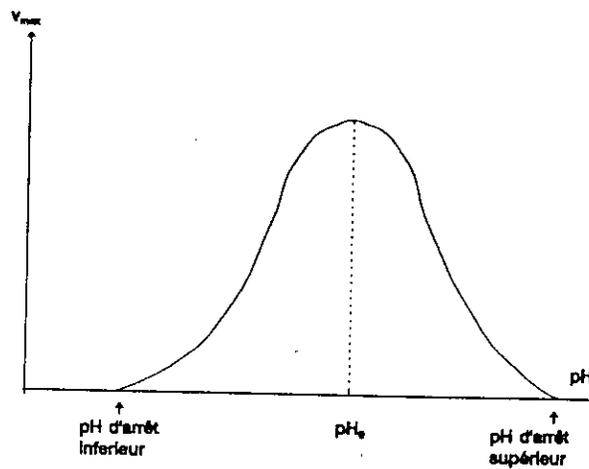


fig 3.6 : Courbe de variation de l'action d'une enzyme en fonction du pH [9]

### II 3.4.2.3 Effecteurs d'Enzyme : les inhibiteurs :

Il s'est avéré que dans des milieux complexes, que des phénomènes d'inhibitions perturbent la cinétique enzymatique. Les inhibiteurs sont des agents chimiques capables de diminuer la vitesse de la réaction enzymatique. Selon la nature de l'inhibiteur, on distingue différents types d'inhibitions.

#### a- Inhibition compétitive :

Les inhibiteurs compétitifs sont des molécules inactives, mais qui par leurs structures moléculaires sont assez semblables pour occuper la place de substrat sur l'enzyme.

La loi de vitesse transformée selon Line Weaver et Burkest donnée par :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{[S]} * \frac{K_m}{V_{max}} \left[ 1 + \frac{[I]}{K_I} \right] + \frac{1}{V_{max}}$$

$K_I = \text{constante d'inhibition}$

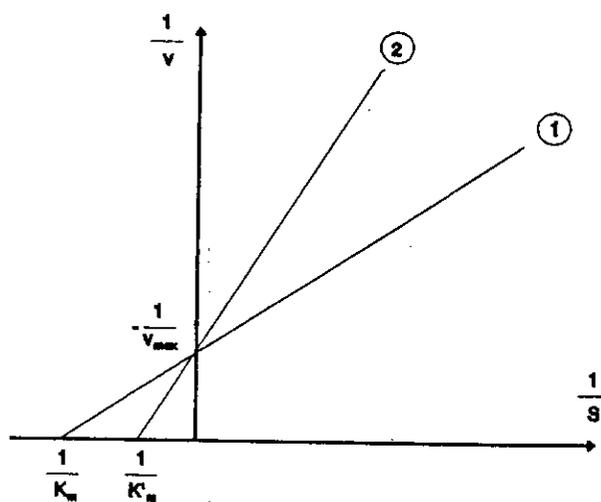


FIG 3.7: Représentation selon Line Weaver et Burk d'une inhibition compétitive.

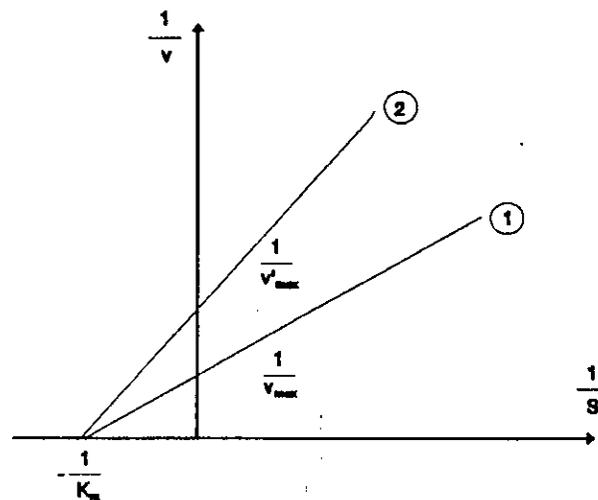
(1) sans inhibition  $[i] = 0$  ; (2) avec inhibition à la concentration  $[i]$ .

**b. Inhibition non compétitive :**

Ce type d'inhibition conduit à la formation des complexes ES , EI et ESI , par fixation de l'inhibiteur non compétitif sur l'enzyme sans empêcher la fixation du substrat , ceci revient à dire que les sites de fixation du substrat et de l'inhibiteur sont différents .

La loi de vitesse transformée, selon Line Weaver et Burk est donnée par :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{S} \cdot \left[ \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{[I]}{V_{\max}} \cdot \frac{K_m}{K_I} \right] + \frac{1}{V_{\max}} \cdot \left[ 1 + \frac{[I]}{K_I} \right]$$



**FIG 3.8 / Représentation selon Line Weaver et Burk d'une inhibition non compétitive**

(1) sans inhibiteur  $[I] = 0$  ; (2) avec inhibiteur à la concentration  $[I]$

c) Inhibition incompétitive:

L'inhibition incompétitive comporte la formation du complexe ternaire inactif ESI. L'inhibiteur ne s'associe qu'une fois le complexe ES formé.

La loi de vitesse transformée selon Lineweaver et Burk est donnée par :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} * \frac{K_m}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} * \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

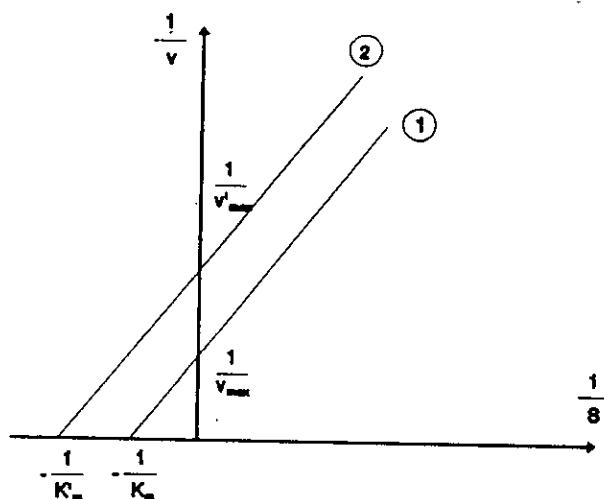
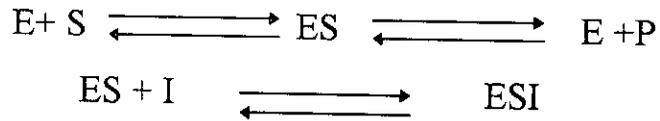


Fig.3.9 Représentation selon Lineweaver et Burk d'une inhibition incompétitive

(1) sans inhibiteur  $[I]=0$  ; (2) avec inhibiteur à la concentration  $[I]$ . [7]

**d) Inhibition par le substrat:**

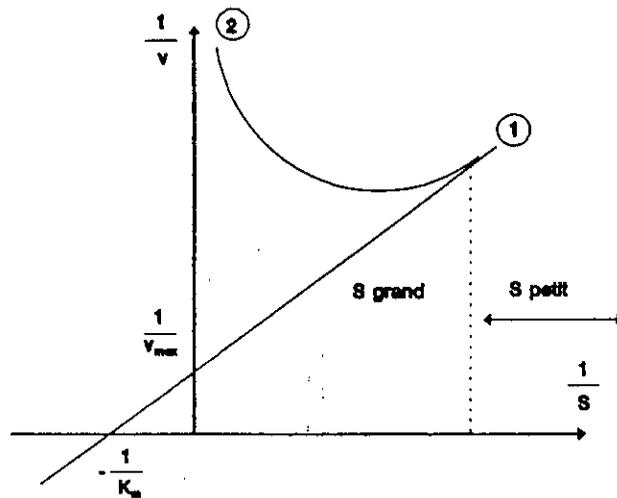
Les réactions régissant le phénomène sont les suivantes:



Une deuxième molécule de substrat se fixe sur le complexe ES et le rend inactif, dans ce cas, la vitesse de la réaction enzymatique a tendance à diminuer.

Elle est déterminée par la relation suivante :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{K_I V_{\max}} \cdot [S]$$



**Fig.3-9: Représentation selon Line Weaver et Burk d'une inhibition par le substrat. (5) (9)**

(1) sans inhibiteur  $[I]=0$  (2) Avec inhibiteur à la concentration  $[I]$

## **II-4 -Hydrolyse enzymatique des résidus ligno-cellulosiques:**

Au cours des dix dernières années, il y'a eu de nombreuses tentatives de valorisation des rejets agricoles et forestiers.

Nous citons: la saccharification de la cellulose en glucose et la production de carburant par couplage d'une cellulolyse enzymatique et d'une fermentation microbienne .

La production de sucre à partir de la biomasse cellulosique se fait par hydrolyse chimique ou enzymatique.

L'hydrolyse enzymatique consiste à l'utilisation d'une enzyme spécifique, ou plus fréquemment d'un mélange d'enzymes pouvant solubiliser les constituants de la biomasse ligno-cellulosique et libérer les sucres, principalement le glucose.

Le glucose produit peut-être utilisé pour la production de carburant.

La biomasse lignocellulosique ne peut-être saccharifier avec un rendement élevé sans prétraitements.

### **II.4.1 Prétraitements :**

L'une des principales limitations du rendement de l'hydrolyse enzymatique du matériel ligno-cellulosique est en fait la mauvaise accessibilité de la cellulose vis à vis des enzymes en raison de la barrière qui constitue la matrice lignine-hémicellulose.

En conséquence, des prétraitements de délignification préalables sont nécessaires pour permettre une accessibilité suffisante de la cellulose vis à vis des cellulases .

Les prétraitements et selon leurs mode d'action sur le substrat sont classés en trois catégories: Physique, Chimique et Biologique.[2]

### II.5.1.1 Prétraitements Physiques:

Les prétraitements physiques peuvent être mécaniques et non mécaniques, les forces physiques utilisées en prétraitement mécanique assurent la fragmentation du matériel ligno-cellulosique en de fines particules ayant un rapport surface/volume permettant une meilleure accessibilité à l'hydrolyse chimique et enzymatique.

#### 1- Le broyage:

Il s'est avéré que le broyage ou la mouture du matériel ligno-cellulosique constitue une méthode efficace pour l'amélioration du rendement de l'hydrolyse. En effet, il permet la réduction de la cristallinité, la diminution du degré de polymérisation, ainsi que l'augmentation de la surface spécifique.

Du point de vue économique, ce prétraitement présente l'inconvénient d'être très coûteux en raison de la consommation élevée d'énergie.

#### 2- Pyrolyse:

Il a été récemment découvert, que la pyrolyse est un processus qui augmente la susceptibilité du matériel ligno-cellulosique à l'hydrolyse.

Au dessus de 300°C, la cellulose se décompose rapidement pour donner des composés gazeux et d'autres bitumeux.

Selon **Shafizadek**, l'hydrolyse acide douce ( $H_2SO_4$ , 1N à 97°C et pendant 2,5h) des fractions goudroneuses produites produit 80% à 85% de sucres réducteurs.

Le type d'atmosphère durant la pyrolyse affecte énormément les réactions pyrolytiques.

### **3. Irradiation à haute énergie:**

L'accessibilité de la cellulose et du matériel ligno-cellulosique à l'hydrolyse augmente sous l'effet de 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.

*Fan et al* ont montré que l'irradiation gamma est très efficace dans l'augmentation de la surface spécifique, due à une dépolymérisation intense, mais non efficace dans la diminution de la cristallinité. Ils ont également montré que ce prétraitement affecte la lignine.

Bien que le traitement à l'irradiation présente de grands avantages techniques, il est peu avantageux économiquement. [27]

### **4. Prétraitement à la vapeur:**

Ce procédé qui permet le fractionnement de l'ensemble des polymères du résidu ligno-cellulosique a été récemment mis au point au Canada par la société Iotek : [2]

Le substrat est soumis à une pression élevée à chaud (225°C-25atm) puis brutalement décompressé. La cellulose obtenue suivant ce procédé est presque totalement hydrolysable. La lignine devient extractible par les solvants tandis que les hémicelluloses sont converties en oligosides solubles. [1] [2].

#### **II.5.1.2 Prétraitement chimique:**

Bien que les prétraitements chimiques ont prouvé leurs efficacité dans l'amélioration du rendement de l'hydrolyse enzymatique, ils présentent un certain nombre d'inconvénients qui ne doivent pas être négligés.

En effet, les consommations des produits chimiques pour la réaction et pour la neutralisation du produit traité sont onéreuses et les polluants engendrés obligent à mettre en place d'importants moyens de traitement et de récupération des réactifs.

Selon la nature chimique du réactif, les prétraitements chimiques sont classés en plusieurs catégories:

### **1- Prétraitements alcalins:**

Les principaux produits utilisés dans ce type de prétraitement sont la soude caustique et l'ammoniaque.

Le prétraitement à la soude caustique a pour effet l'augmentation de la surface spécifique, la diminution du degré de polymérisation, la diminution de la cristallinité, la séparation des liaisons structurales entre lignine et carbohydrates, et la destruction de la structure de la lignine [27].

### **2- Prétraitements acides:**

Ce type de prétraitement a surtout été proposé dans l'objectif d'une valorisation de la cellulose en ethanol. Il se base sur la différence de résistance à l'hydrolyse acide entre hémicellulose et cellulose.

Il utilise généralement du  $H_2SO_4$  à des concentrations de 1 à 3 %.

Les températures et durées de traitement varient suivant les technologies utilisées.

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 les lignines.

Les sucres sont instables en milieu acide chaud et se dégradent en composés aldéhydriques de type furfural. Ces produits de dégradation inhibent les

fermentations, le choix des conditions expérimentales est donc compromis visant la vitesse d'hydrolyse des hémicelluloses la plus élevée pour une formation de produits toxiques compatibles avec une utilisation en fermentation des sucres produits [1].

D'autres acides peuvent être utilisés tels que l'acide chlorhydrique, l'acide phosphorique, et l'ozone, etc...

### 3- Solvants de la cellulose:

Les solvants tels que l'oxyde de triéthylamine, strontium thiocyanates améliorent très sensiblement la dégradabilité de la cellulose. Le plus efficace est le *Cadoxen* (solution alcaline d'éthylènediamine) qui permet des rendements d'hydrolyse proches de 90% au lieu de 20% pour le même substrat non traité [27].

#### II.5.1.3 Prétraitements biologiques:

Ce type de prétraitement utilise des micro-organismes ayant la capacité de sécréter des préparations enzymatiques qui dégradent la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Ce sont généralement des champignons de pourriture blanche, brune et rouge.

Les champignons de pourriture blanche dégradent simultanément la cellulose : les hémicelluloses et les lignines par leurs complexes cellulolytiques qui contiennent des endo-glucanases, des exo-glucanases et des B-glucosidases. Il s'agit principalement de Basidiomycetes (ex : *Coriolus versicolor*) mais aussi d'ascomycetes (ex: *Trichoderma-reesei*)

Les champignons de pourriture brunes sont presque tous des basidiomycètes. Ils sont taxonomiquement proches des champignons de pourriture blanche. Ils dégradent la cellulose et les hémicelluloses. Ces champignons produisent des endo-glucanases, mais pas d'exo-glucanases, ceci ne présente pas d'obstacle à la

dégradation de la cellulose cristalline qui s'effectue selon un mécanisme faisant appel au système oxydatif  $H_2O_2/Fe^{2+}$  [2] [7].

Le prétraitement biologique, et bien qu'il provoque une augmentation spectaculaire de la dégradabilité de la cellulose reste coûteux.

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

## II.4.2- Hydrolyse enzymatique :

### II.4.2.1 Le système enzymatique:

Un substrat aussi complexe que la biomasse ligno-cellulosique ne peut être hydrolysé totalement par une seule enzyme. Le système enzymatique excrété par *Trichoderma reesei* est donc un mélange de différentes enzymes coopérant entre-elles. Ce système est composé essentiellement de trois grandes classes d'enzymes.

**Les endo-glucanases:** qui sont des glycoprotéines dont la partie glucidique peut atteindre 20% de la masse de l'enzyme, leurs points isoélectriques sont acides et leurs pH optimal compris entre 4 et 7. Leurs poids moléculaires sont voisins de 30,000 à 40,000, mais dans certains cas aux alentours de 13,000.

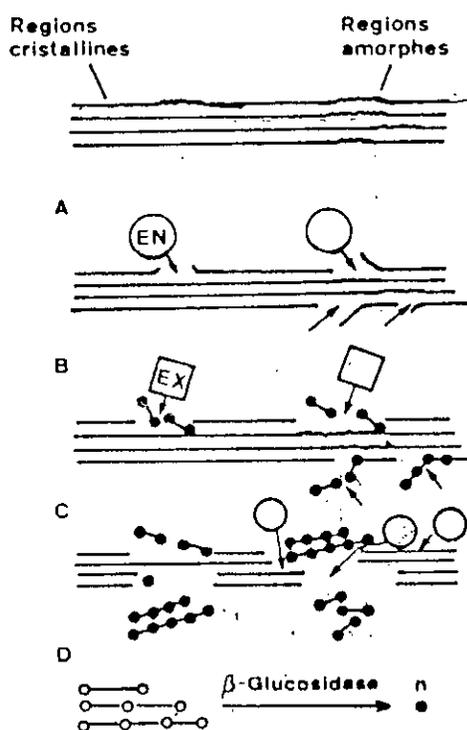
Les endo-glucanases opèrent de façon aléatoire, des coupures à l'intérieur des chaînes de cellulose et créent des sites d'attaque pour les exo-glucanases [1].

**Les exo-glucanases:** sont de deux types: cellobiohydrolases (CBH=B-1,4-glucane-4-cellobiodrolases) ou glucohydrolases (GH=B-1,4-glucane-4-glucohydrolases) appelées aussi exoglucosidases, qui libèrent du cellobiose ou du glucose, respectivement à partir de l'extrémité non réductrice des chaînes de B-glucanes.

Les **B-glycosidases** (B-D-glucane-4-glucohydrolases) libèrent du glucose à partir des oligomères libérés par l'action d'endo et / ou d'exo-glycanases (**CBH**). Leur affinité pour leur substrat augmente lorsque le degré de polymérisation décroît, et présente un maximum pour le cellobiose, d'où le nom de cellobiase fréquemment utilisé.

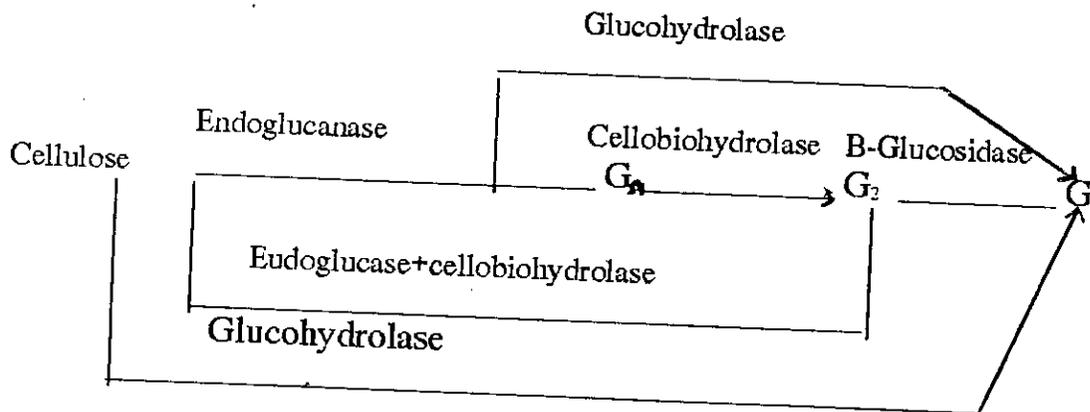
La stabilité et l'activité maximales de ce complexe sont atteintes à un pH=5 et une température de 50°C. [2]

D'après **Montenecourt et Eveleigh**, la figure 4.1 schématise la conception actuelle du mécanisme d'action des cellulases sur la fibrille de cellulose.



**Fig. 5.1 Mécanisme d'action des cellulases sur la fibrille de cellulose [1].**

La figure 4.2 schématise le mécanisme général de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose -



**Fig 3.2: Conception actuelle du mécanisme de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose**

G = glucose [2]

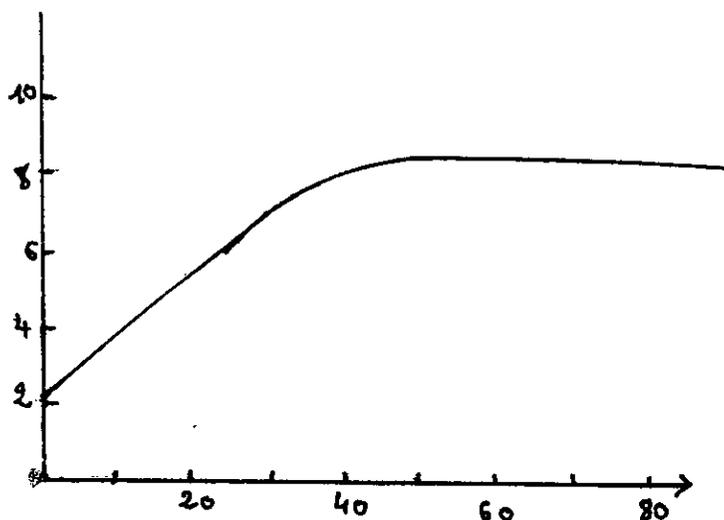
#### II. 4.2.2 Régulation enzymatique:

L'activité du complexe cellulosique est soumise à une régulation précise à travers les inhibitions subies par chacun des constituants. Les B-glucosidases sont très fortement inhibés par la gluconolactone, chez le *T.reesi*, la constante d'inhibition pour ce composé est de  $3,2 \cdot 10^{-5} M$ . Le glucose provoque aussi une inhibition compétitive mais plus faible. Enfin, ces enzymes sont inhibées par leur substrat, le cellobiose.

Les exo-glucanases sont inhibées par la cellubionolactone et le gluconolactone. Le glucose est aussi inhibiteur, mais c'est le cellobiose, inhibiteur compétitif, qui influe le plus sur cette activité.

### II. 4. 5.2.3 Effet de la lignine sur l'hydrolyse :

La lignine constitue l'obstacle majeur pour l'attaque enzymatique du matériel ligno-cellulosique. En effet, la relation entre le degré de délignification et la vitesse d'hydrolyse par le *T. reesei* est représenté par la figure 4.3.



Fan et al ont observé que la vitesse d'hydrolyse de la paille de blé augmente considérablement avec l'augmentation du degré de delignification jusqu'à ce que celui-ci atteigne 50%. Au delà de cette valeur, la vitesse d'hydrolyse augmente très peu. [27].

### II.4.2.5 Cinétique de l'hydrolyse enzymatique:

La cellulose est un substrat insoluble, or la cinétique Michaélienne s'applique à des systèmes en solution; en conséquence aucune des tentatives pour adapter le modèle Michaélien à la cinétique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose n'est convaincante.

En fait, les modèles alternatifs décrivant ce phénomène de catalyse hétérogène ne sont pas très satisfaisant, et ceci pour deux raisons principales:

De nombreuses endo-glucanases sont notablement affectées par des concentrations de cellobiose supérieures à  $3 \cdot 10^{-3} \text{M}$ . Le cellobiose est aussi le principal inhibiteur de l'action coopérative des endo- et exo-glucanases.

Les principaux régulateurs sont donc le glucose et le gluconolactone pour les B-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 au retro-inhibition pour augmenter le taux de dégradation de la cellulose.

#### **II. 4.2.3 Effet de la cellulose sur l'hydrolyse enzymatique:**

La sensibilité de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique dépend étroitement de l'état du substrat et notamment de trois caractéristiques connues pour limiter le plus fortement l'accessibilité aux enzymes hydrolytiques:

- 1) - L'incrustation par les polymères non cellulosique (éventuellement la lignine) auxquels la cellulose est associée dans la paroi végétale.
- 2) - La cristallinité
- 3) - La surface spécifique .

L'état de la cellulose, défini suivant ces trois paramètres conditionne la vitesse et le rendement de l'hydrolyse enzymatique [2].

- Le substrat est mal défini <sup>tant</sup> dans son état initial (surface spécifique, cristallinité, degré de polymérisation) que dans ses transformations au cours de l'hydrolyse.
- l'Enzyme est un complexe dont le mode d'action global n'est pas complètement éclairci, ce qui interdit de définir des séquences de réaction faisant apparaître des entités moléculaires complètement définies.

Quelques grands traits ont pu néanmoins être dégagés. La vitesse initiale de la réaction est sous la dépendance des deux caractéristiques structurales majeurs de la cellulose:

La surface spécifique et la cristallinité. L'adsorption des protéines solubles sur le substrat est linéairement reliée à sa surface spécifique, mais la capacité des enzymes adsorbées à provoquer l'hydrolyse dépend étroitement de la cristallinité initiale.

La vitesse d'hydrolyse décroît de façon importante au cours du temps, en conséquence, la mesure de la vitesse initiale ne permet pas de prédire la cinétique globale. Ce ralentissement est dû d'une part à la transformation de la cellulose en un substrat moins facilement hydrolysable, d'autre part à une inhibition des enzymes par les produits de la réaction. [2]

### II.4.3 Hydrolyse acide

Le processus de l'hydrolyse acide (par le  $H_2SO_4$ , le  $HCl$  ou le  $H_3PO_4$ ) catalyse la formation de sucres, par solubilisation des constituants de la biomasse lignocellulosique.

L'hydrolyse acide, directe de la cellulose présente des inconvénients non négligeables. **Rimington** les résume en ces termes:

*« La méthode d'hydrolyse acide directe possède de sérieux inconvénients qui peuvent être énumérés: comme suit:*

*Si la période de chauffage est très courte ou la température pas suffisamment élevée, l'hydrolyse peut être incomplète.*

*L'hydrolyse acide de la cellulose catalyse la formation de sucres, mais également la dégradation de ces sucres en produits indésirables; l'acide formique, le furfural et l'hydrxymethyl furfural. La formation de ces produits est liée à la concentration, à la température et la durée de chauffage.*

*En présence de certains acides aminés ou de produits de désintégration des protéines et des acides forts chauds, les glucides se condensent avec les substances azotées pour former une substance noirâtre . » [30]*

De ceci , on peut conclure nettement que l'hydrolyse de la cellulose avec des acides fournit une teneur en glucides considérablement plus basse que celle existante réellement.

## II.5 Les Réacteurs

Un réacteur est un corps creux à l'intérieur duquel circule un ou plusieurs fluides [18] .

Un réacteur biologique constitue le coeur de toute transformation de la matière sous l'effet de micro-organismes ou d'enzymes. Il doit comprendre un certain nombre d'accessoires ;

- un agitateur
- une tubulaire de prise d'échantillon
- un dispositif de régulation de température
- un dispositif de régulation du pH .

### II -5.11 Classification des réacteurs :

La classification des réacteurs est basée sur trois critères importants, à savoir la nature des phases en présence, le mode de fonctionnement et la structure hydrodynamique .

**a) Selon la nature des phases en présence :** Dans ce cas on distingue :

- \* *système monophasique* : le système réactionnel est constitué par une seule phase.
- \* *système polyphasique ou hétérogène* ; le système réactionnel est constitué par deux phases ou plus.

**b) selon le mode de fonctionnement :** Dans ce cas, le choix entre un mode de fonctionnement discontinue et une opération réalisée en continu .

***Réacteur discontinu (fermé) :***

Un réacteur discontinu est un réacteur dans lequel on charge au départ une quantité donnée de matière qu'on laisse en suite ,évoluer en fonction du temps.

***Réacteur discontinu (fermé):***

Un réacteur discontinu est un réacteur dans lequel on charge au départ une quantité donnée de matière qu'on laisse en suite évoluer en fonction du temps .

**c) Selon la structure hydronamique;** la façon dont se fait l'écoulement permet de définir différents types de réacteurs:

***Réacteurs à écoulement piston:***

Le mélange réactionnel progresse par tranche parallèle. Ce type d'écoulement a lieu lorsqu'on fait circuler à grande vitesse <sup>un</sup> fluide visqueux dans un tube.

***Réacteur continu parfaitement agité:***

La composition du mélange réactionnel est la même en tout point du réacteur ainsi qu'à sa sortie. Le temps de séjour n'est pas le même pour toutes les particules(DTS)[22].

## II.6.2 Formulation générale du bilan de matière pour un réacteur fermé

La loi de conservation d'une grandeur extensive est donnée par :

$$\text{Flux d'entrée} + \text{Flux de création} = \text{Flux de Sortie} + \text{Flux d'accumulation} + \text{Flux de disparition}$$

Effectuant le bilan de matière pour un réacteur fermé de volume  $V$ , dans lequel, on a introduit à l'instant  $t = 0$  une quantité de substrat  $S_0$  et une quantité d'enzyme  $E$

|         | Substrat | Enzyme | Produit |
|---------|----------|--------|---------|
| $t = 0$ | $S_0$    | $E$    | $O$     |
| $t$     | $S$      | $E$    | $P$     |

Flux d'entrée + flux de création = Flux de sortie + flux d'accumulation + flux de disparition

- \* Flux d'entrée = 0 Pas d'alimentation durant la réaction.
- \* Flux de sortie = 0 pas de soutirage durant la réaction,
- \* Flux de création = 0 pas de création du substrat.
- \* Flux d'accumulation =  $V ds$  représente la quantité de substrat qui n'a pas été transformée.
- \* Flux de disparition =  $v \cdot V dt$  représente la quantité de substrat qui a été transformée.

Avec  $V$ : vitesse de disparition

En remplaçant dans l'équation (1) on obtient :  $0 = Vds + vVdt$

d'où  $ds + vdt = 0$

$$v = - ds/dt$$

Dans le cas d'une cinétique Michaelienne:

$$v = V_{\max} [S]/([S]+K_M)$$

d'où

{ INCORPORER Equation.2 }

ou alors  $[1 + K_M/[S]]ds = -V_{\max}dt$

Après intégration et en posant  $x = S_0 - S / S_0$  on obtient l'équation du bilan suivant:

$$XS_0 - K_M - \ln(1-X) = V_{\max} t$$

$X$ ,  $S_0 / K_M$  et  $V_{\max} / K_M$  sont des paramètres adimensionnels avec  $X$  représentant le taux de conversion[9].

**PARTIE  
EXPERIMENTALE**

### III.1 MATERIELS ET METHODES

Au cours de la campagne oléicole 94-95, une quantité de 10Kg de grignon a été prélevée, directement au moulin au niveau de l'huilerie de Tadmaït, qui utilise un mélange de variétés d'olives sur lequel elle applique un procédé d'extraction classique « la double pression ».

L'échantillon prélevé est constitué de pulpes et de fragments de noyaux

#### III.1.2 PREPARATION DU SUBSTRAT

L'échantillon récupéré a été gardé pendant quelques jours en sacs de plastique, puis traité comme suit en vue de préparer le substrat expérimental

##### a) Séchage:

L'échantillon prélevé a été séché à l'étuve à 70 °C en vue de conservation.

##### b) Broyage:

L'échantillon séché a été finement broyé dans un moulin **Retsch**, donnant ainsi une poudre suffisamment homogène.

##### c) Tamisage :

La poudre obtenue a été tamisée (tamis<sup>de</sup> granulométrie égale à 710µm) en vue d'obtenir un substrat uniforme et de granulométrie déterminée.

### **III.1.3 Détermination des principales caractéristiques du substrat expérimental:**

La matière sèche (MS), les cendres (CT), les matières grasses (MG), la cellulose brute (CB) et les matières azotées totales (MAT) ont été déterminées par les méthodes <sup>classique</sup> d'analyses des fourrages [4].

Les composés pariétaux (lignine, cellulose, hémicellulose) ont été déterminées par la méthode de **Van Soest** [4].

#### **a) Matière Sèche :**

La matière sèche est définie comme étant le résidu obtenu après dessiccation à 105°C dans une étuve d'une prise d'essai de 5 g de substrat.

#### **b) Cendres Totales :**

Les cendres totales sont définies comme étant le résidu obtenu après calcination à 550°C dans un four à moufle d'une prise d'essai de 5 g de substrat.

Complémentairement au dosage des cendres brutes, la détermination spécifique des éléments minéraux ( $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Na^+$ ) s'avère dans certains cas nécessaire. Elle est réalisée par photométrie de flamme.

#### **c) Matières Grasses :**

La teneur en matières grasses (MG) est déterminée par pesée, après extraction à l'éther de pétrole et séchage à l'étuve à 105 °C durant 48 heures.

#### **d) Matières Azotées Totales:**

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

Dans cette méthode, l'azote organique est transformé en azote ammoniacal (sulfate d'ammonium) par minéralisation par l'acide sulfurique concentrée en présence d'un catalyseur (oxyde de mercure, sélénium, sulfates de cuivre). L'azote ammoniacal est ensuite déplacé par un alcali (soude) et l'ammoniac libéré dosé titrimétriquement par une solution d'acide sulfurique.

Le taux de protéines est obtenu en multipliant la teneur en azote total trouvée par le facteur conventionnel 6.25

#### **e) Cellulose brute:**

La teneur en cellulose brute (CB) est déterminée par la méthode de **Weende** [12]. Dans cette méthode les matières cellulosiques correspondent au résidu organique insoluble obtenu après attaque acide ( $H_2SO_4$  0.26 N) et alcaline (NaOH 0.31 N) du substrat.

#### **f) Composés pariétaux :**

La teneur en composés pariétaux (cellulose, hémicellulose et lignine) est déterminée par la méthode de Van Soest. Cette technique analytique dont le principe est reproduit sur le diagramme.1 permet d'isoler successivement 3 résidus à savoir;

- \* NDF ( Neutral detergent fiber) qui constitue l'essentiel de la paroi végétale
- \* ADF (Acid detergent fiber) qui correspond à la ligno-cellulose.
- \* ADL (Acide detergent lignine) qui correspond à la lignine

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la matière sèche.

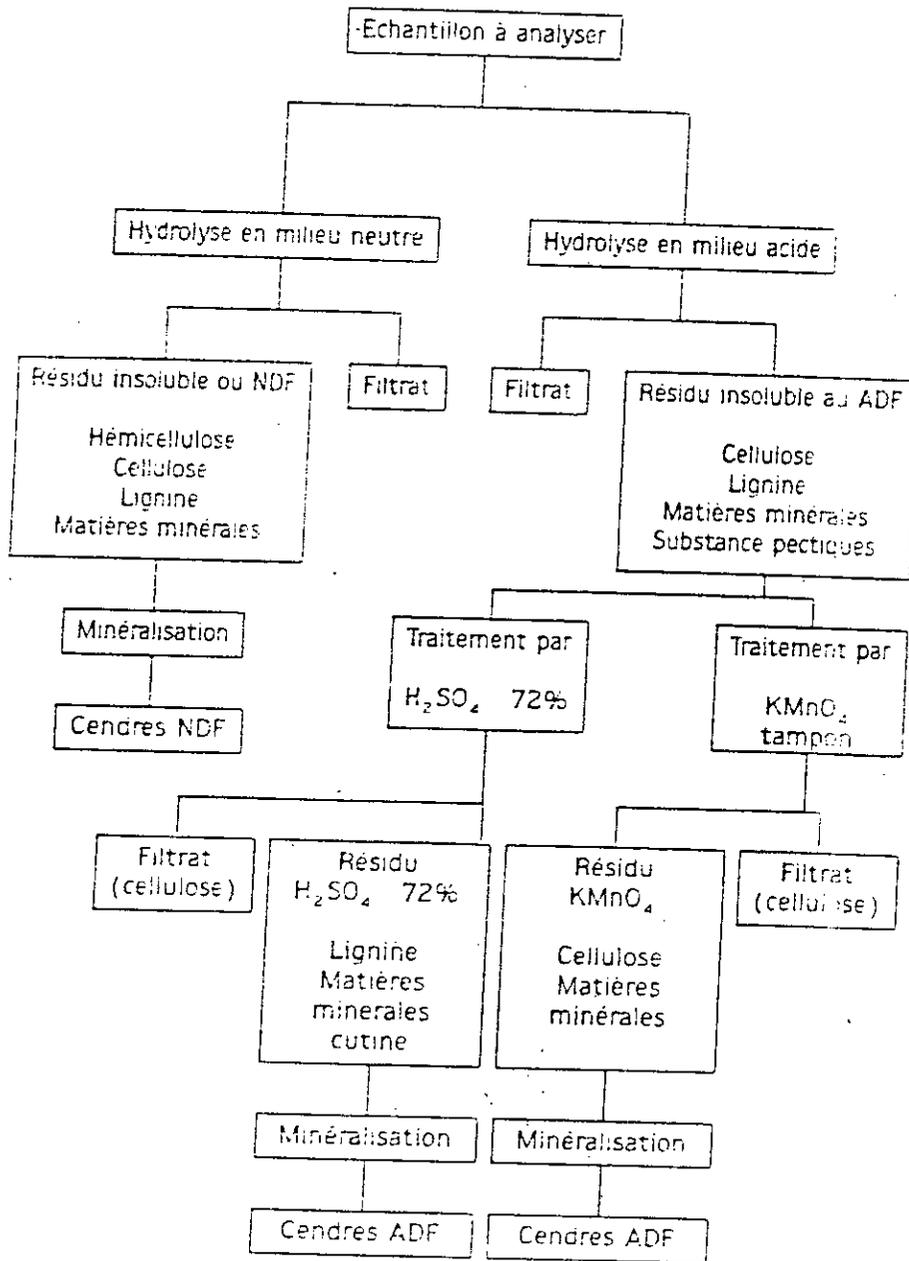


Diagramme 1. Schéma de Principe de la méthode de VAN SEOST

### III.1.4 Prétraitements chimiques

Les prétraitements chimiques en général, et les prétraitements alcalins en particulier ont prouvé leur efficacité dans l'augmentation du rendement de l'hydrolyse enzymatique. Pour cette raison, nous avons opté pour le prétraitement alcalin à la soude caustique.

#### III.1.4.1 Effet des paramètres physico-chimiques sur le prétraitement à la soude caustique

Selon **Meleion** (1978), l'efficacité du traitement à la soude dépend de plusieurs paramètres; a savoir le taux de réactif, la température, la durée de traitement et la nature du substrat en présence. De ce fait, nous avons étudié l'effet de ces paramètres sur le degré de saccharification.

##### a) Effet de la concentration de soude:

Pour pouvoir suivre l'effet du paramètre « *concentration de soude* » et voir son impact sur la saccharification, il a été impératif de le faire varier, tout en gardant les autres paramètres tels que la température, durée de traitement et quantité de substrat constants.

Pour cela, nous avons choisi 4 concentrations de soude différentes 30,60,100, 120 g/l. Quant aux autres paramètres nous avons opté pour

- Une concentration de 100 g/l de grignon
- Une durée de traitement de 1 heure
- Une température de 90 °C
- une agitation modérée de 200 tours/mn

### **Mode opératoire:**

Quatre échantillons de 10 g de grignon d'olives sont traités comme suit :

- ◆ Préparer 100 ml de solution contenant la quantité de NaOH voulue expérimentalement
- ◆ Mettre la solution préparée dans un becher et le placer sur une plaque chauffante.
- ◆ Mettre l'agitation en marche (200 tours/mn)
- ◆ Ajuster la température
- ◆ Après avoir fixé tous les paramètres opératoires, introduire la quantité de grignon préalablement pesée dans le bécher à un temps initial  $t_0$
- ◆ Prendre des prélèvements de 1 ml chacun à des intervalles de temps très rapprochés en début de réaction, puis un peu plus éloignés par la suite avec filtration immédiate
- ◆ Les sucres totaux contenus dans le filtrat sont alors quantifiés par la méthode de **Dubois *et al*** (annexe)

A partir des résultats obtenus , nous traçons les graphes donnant l'évolution:

- De la concentration en sucres totaux produits en fonction du temps et ceci pour chaque concentration de soude.
- Du taux maximal de production de sucres en fonction de la concentration de soude.

### **b) Effet de la température**

L'étude suivante permet de suivre l'effet de la température sur la saccharification. Pour cela , nous avons travaillé à deux températures, l'une élevée (90°C) et l'autre basse (25°C). Quant aux autres paramètres, nous avons choisi

- Une concentration de 100 g/l de grignon
- Une concentration de 100 g/l de soude
- Une durée de traitement de 1 heure
- Une agitation modérée de 200 tours /mn

### ***Mode opératoire***

Le même mode opératoire que celui décrit précédemment a été suivi:

A partir des résultats obtenus, nous tracerons le graphe donnant l'évolution de la concentration en sucres totaux produits en fonction du temps

### **c) Effet de la durée de traitement:**

En vue de déterminer le temps optimum de ce traitement , nous avons fait varier ce paramètre entre 0 et 2 heures. Quant aux autres paramètres, nous les avons fixé comme suit:

- Une concentration de 100 g/l de grignon
- Une concentration de 100 g/l de soude
- Une température de 90 °C
- Une agitation modérée de 200 tours /mn

### ***Mode opératoire***

Le même mode opératoire que celui décrit précédemment a été répété.

A partir des résultats obtenus, nous tracerons la courbe donnant l'évolution de la concentration de sucres totaux produits en fonction du temps.

### III.1.4.2 Influence du prétraitement à la soude caustique sur la composition chimique du substrat traité.

L'étude suivante permet de déterminer l'effet du prétraitement à la soude caustique sur la composition chimique du substrat

Pour cela, nous traiterons un échantillon de 10 g de grignon à la soude caustique, dans les conditions opératoires optimales précédemment déterminée.

#### *Mode opératoire*

- ◆ Préparer 100 ml de solution contenant 10 g de grignon.
- ◆ Mettre la solution préparée dans un bécher et le placer sur une plaque chauffante.
- ◆ Mettre l'agitation en marche
- ◆ Ajuster la température à la valeur voulue expérimentalement.
- ◆ Après avoir fixé tous les paramètres opératoires, dans le bécher à un temps initial  $t_0$
- ◆ Laisser l'expérience en marche durant 1 heure
- ◆ Filtrer la solution à travers un filtre en soie de Nylon
- ◆ Récupérer le résidu et le sécher à l'étuve à 70 °C
- ◆ Doser sur le résidu séché, les teneurs en cendres totales, en matière grasses, en matières azotées totales et en cellulose brute, par les méthodes classiques d'analyses des fourrages, citées précédemment

### III.1.5 Hydrolyse Enzymatique.

L'étude expérimentale de la cinétique enzymatique consiste à suivre en fonction du temps l'évolution de l'hydrolyse enzymatique du grignon d'olive par une enzyme cellulolytique « cellulose CT »

La cellulose utilisée « Cellulose CT » est référencée commercialement sous le N° K 193424. Elle est caractérisée par un pH optimum de 4.5 et une température de 37°C données par le fabricant.

Le réacteur utilisée est un réacteur en batch, il est schématisé par la figure N° 6 -1

### III.1.5 Etude de la cinétique enzymatique en fonction de la concentration d'enzyme.

Pour mener à bien notre cinétique, il a fallu d'abord déterminer la quantité d'enzyme permettant d'aboutir au meilleur rendement-concentration en cellulose sur une masse de grignon prétraitée à la soude caustique à 10 % pendant 1 heure. Ainsi, nous avons travaillé à des concentrations d'enzyme de l'ordre de 1-1.5 et 2 g/l. Quant aux autres paramètres, nous les avons fixés:

- Une concentration de 45 g/l de résidu résultant du prétraitement
- Une température de 37 °C
- un pH de 4.5
- Une durée de traitement de 5 heure
- Une agitation modérée de 270 tours /mn

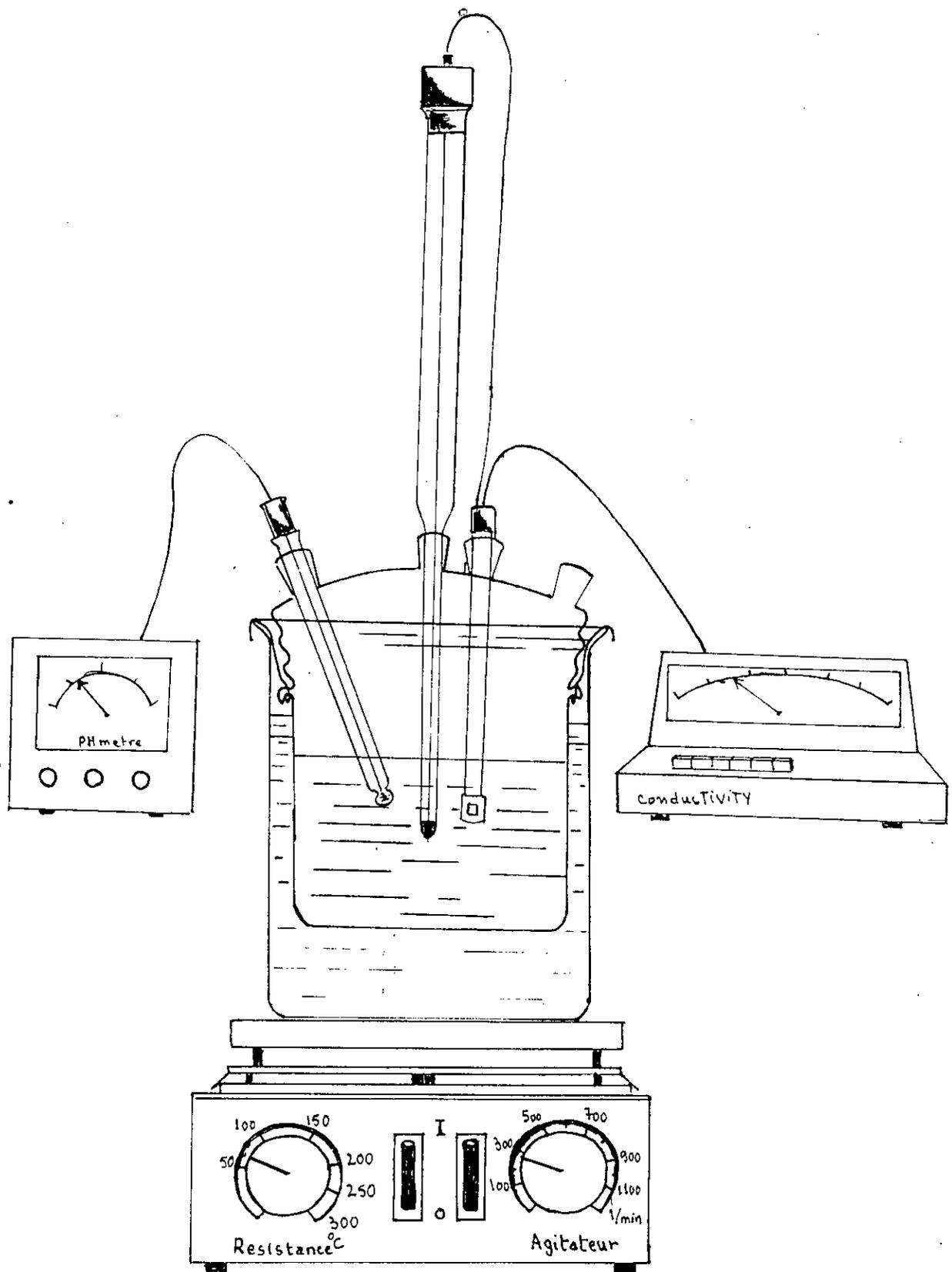


Fig 6-4 Bioreacteur

### *Mode opératoire*

- ◆ On prépare la solution de substrat , par incorporation de celui-ci dans 200 ml de solution tampon à pH 4.5
- ◆ On remplit le réacteur avec la solution de substrat préparée
- ◆ On met l'agitation en marche
- ◆ On ajuste la température à 37 °C
- ◆ Après avoir fixé toutes les conditions opératoires, la quantité d'enzyme préalablement pesée est introduite rapidement dans le réacteur à un temps  $t_0$  représentant le temps initial de l'hydrolyse.
- ◆ 30 secondes après, un échantillon de 50 $\mu$ l est prélevé du mélange réactionnel puis transvasé dans un tube contenant 10 ml de solution tampon à pH 7 afin d'arrêter la réaction d'hydrolyse.
- ◆ Prendre par la suite plusieurs prélèvements de 50 $\mu$ l à des intervalles de temps fixés en minutes, puis les transvaser dans des tubes contenant 10 ml de solution tampon à pH 7
- ◆ 10-15 minutes après le prélèvement, le contenu du tube est filtré à travers de la soie de Nylon.
- ◆ Les sucres totaux contenus dans le filtrat sont alors quantifiés par la méthode calorimétrique de **Dubois *et al*** [22].

A partir des résultats obtenus, nous traçons le graphe donnant l'évolution de la concentration en sucres totaux.

A partir des résultats obtenus , nous traçons le graphe donnant l'évolution de la concentration en fonction du temps.

### III.1.6 Hydrolyse Acide.

L'étude suivante consiste à suivre la cinétique de l'hydrolyse chimique du grignon d'olive par l'acide sulfurique  $H_2SO_4$  à 3 % à une température de  $100^\circ C$  durant 5 heures .

#### Mode opératoire :

- ◆ Peser 10 g de grignon
- ◆ Préparer 1 litre de solution acidifiée à l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) à 3 %
- ◆ Mettre la solution préparée dans un erlen à col rodé de 1 litre muni d'un réfrigérant à reflux
- ◆ Mettre l'agitation en marche (200 tours/mn)
- ◆ Chauffer le système à une température de  $100^\circ C$  , et qui sera maintenue constante durant toute l'expérience
- ◆ Après avoir fixé toutes les conditions opératoires ; introduire l'échantillon pesée à un temps  $t_0$  représentant le temps initial de l'hydrolyse
- ◆ 30 secondes après , un échantillon de 1 ml est prélevé du mélange réactionnel qu'on filtre directement , à travers de la soie de Nylon dans un tube à essai .

C'est ainsi qu'à des intervalles de temps très rapprochés en début de réaction puis un peu plus éloignées par la suite plusieurs prélèvements de 1 ml sont prélevés et directement filtrés dans des tubes à essai et cela durant 5 heures .

Les sucres totaux contenus dans le filtrat sont alors quantifiées par la méthode de Dubois *et al* [22] .

### III.2 RESULTATS EXEPRIMENTAUX ET INTERPRETATIONS:

#### III.2.1 Principales caractéristiques du substrat expérimental

Au cours de cette étude, nous avons déterminé les principales caractéristiques du substrat expérimentaux utilisé.

Les teneurs moyennes en matière sèche, matière organique, matières grasses, cellulose brute, matières azotées totales, neutral detergent fiber, acid detergent fiber, cellulose vraie, hémicellulose et lignine sont présentées sur le tableau 2.1

Tab2.1 *Principales caractéristiques du substrat expérimental en % de la matière sèche*

|                 |       |
|-----------------|-------|
| M.S             | 89.11 |
| M.O             | 95.22 |
| M.G             | 11.73 |
| C.B             | 43.20 |
| M.A.T           | 7.32  |
| C.T.            | 4.78  |
| N.D.F.          | 72.96 |
| A.D.F           | 39.13 |
| Cellulose vraie | 29.14 |
| Hémicellulose   | 33.83 |
| Lignine         | 13.89 |

Les teneurs moyennes en éléments minéraux,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ , et  $Na^+$  sont présentées sur le tableau 2.2

Tab. 2.2 Les teneurs en éléments minéraux en % de M.S.

|           |       |
|-----------|-------|
| $K^+$     | 0.098 |
| $Ca^{++}$ | 0.037 |
| $Na^+$    | 0.019 |

La teneur en cendres totales trouvée expérimentalement (4.78% de la M.S.) coïncide avec la valeur citée en bibliographie qui est de l'ordre de 5% de la M.S. (4)

Les teneurs en éléments minéraux obtenus sont du même ordre que celles citées par d'autres auteurs [4]. En effet la prédominance de  $K^+$  et  $Ca^{++}$  est confirmée

La teneur en matières grasses trouvée est de 11.73 % de la M.S. cette valeur est proche de celle citée par Nefzaoui [4]. Qui est de l'ordre de 13 % de la M.S (4). L'écart trouvée entre ces deux valeurs est lié au procédé technologique employé (type de presse, durée de traitement ... etc.)

La teneur en matière azotées totales (MAT) obtenue est de 7.32 % de la M.S., des teneurs aussi faibles ont été mesurées par Nefzaoui [4] qui obtient des valeurs allant de 5 à 10.3 % de la M.S. témoignant de la faible valeur énergétique de ce substrat.

La teneur en cellulose brute du grignon traité est élevée. En effet nous obtenons des valeurs de l'ordre de 43.2 % de la M.S. C'est cette teneur en cellulose brute qui va faire l'objet de l'hydrolyse aussi bien chimique que enzymatique, en vue de la production des sucres fermentescibles.

La méthode de Van Soest montre que la membrane représente un constituant essentiel du grignon 72.96 % de la M.S. Des teneurs du même ordre de grandeur ont été enregistrées par Hammouda [6] et Gacem [6] qui ont

travaillé respectivement sur le marc de raisin (72.% de la M.S) et la paille de blé (88% de la M.S)

La proportion de cellulose vraie est inférieure à la proportion de cellulose brute (25.14 % contre 43.20 % de la M.S.).

La fraction de lignine brute s'avère importante (20% de NDF) C'est cette fraction qui va constituer un obstacle majeur pour l'hydrolyse aussi bien acide qu'enzymatique.

**Conclusion :**

*D'après les analyses effectuées, on peut conclure<sup>que</sup> le substrat étudiés est caractérisé par une forte teneur en cellulose brute. C'est cette fraction de cellulose qui constitue l'objectif essentiel de tout procédé d'hydrolyse des biomasses lignocellulosiques.*

## III.2.2 Prétraitements chimiques

### III.2.2.1 Effet des paramètres physico chimiques sur le prétraitement à la soude

Cette étude est réalisée dans le but de suivre l'effet des paramètres physico-chimiques, à savoir ; concentration de soude, température et durée de traitement sur l'évolution de la saccharification.

#### a) Effet de la concentration de soude

Le but de cette étude est de suivre l'effet de la concentration de soude caustique sur l'évolution de la saccharification. Pour cela différentes concentrations de cette dernière ont été utilisées. Les résultats obtenus sont présentés sur les tableaux 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 respectivement.

#### Tab 2-3

##### 1. [NaOH] = 30 g/l

| Temps (mn)                         | 0      | 5      | 10     | 15     | 25     | 30     | 45     | 60     |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| g de sucres produit/l              | 0.55   | 0.93   | 1.13   | 1.13   | 1.45   | 1.55   | 1.55   | 1.55   |
| g de sucres produit /g de grignon  | 0.0055 | 0.0093 | 0.0113 | 0.0113 | 0.0145 | 0.0155 | 0.0155 | 0.0155 |
| g de sucres produit/g de cellulose | 0.014  | 0.023  | 0.029  | 0.029  | 0.038  | 0.04   | 0.04   | 0.04   |
| Rendement                          | 1.4    | 2.3    | 2.9    | 2.9    | 3.8    | 4.0    | 4.0    | 4.0    |

**Tab2.4 [NaOH]= 60 g/l**

| Temps (mn)                         | 0          | 5          | 10         | 25         | 40         | 50          | 60          |
|------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| g de sucres produit/l              | 2.33       | 2.47       | 2.61       | 3.63       | 3.74       | 4.86        | 4.9         |
| g de sucres produit /g de grignon  | 0.0233     | 0.0247     | 0.0261     | 0.0363     | 0.0374     | 0.0486      | 0.049       |
| g de sucres produit/g de cellulose | 0.06       | 0.064      | 0.068      | 0.094      | 0.097      | 0.126       | 0.127       |
| <b>Rendement</b>                   | <b>6.0</b> | <b>6.4</b> | <b>6.8</b> | <b>9.4</b> | <b>9.7</b> | <b>12.6</b> | <b>11.8</b> |

**Tab2.5 [NaOH]= 100 g/l**

| Temps (mn)                         | 0          | 5          | 10         | 25          | 40          | 51          | 60          |
|------------------------------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| g de sucres produit/l              | 3.65       | 3.72       | 3.84       | 4.34        | 4.92        | 4.95        | 5.66        |
| g de sucres produit /g de grignon  | 0.036      | 0.037      | 0.038      | 0.043       | 0.049       | 0.050       | 0.057       |
| g de sucres produit/g de cellulose | 0.094      | 0.097      | 0.099      | 0.113       | 0.128       | 0.129       | 0.148       |
| <b>Rendement</b>                   | <b>9.4</b> | <b>9.7</b> | <b>9.9</b> | <b>11.3</b> | <b>12.8</b> | <b>12.9</b> | <b>14.8</b> |

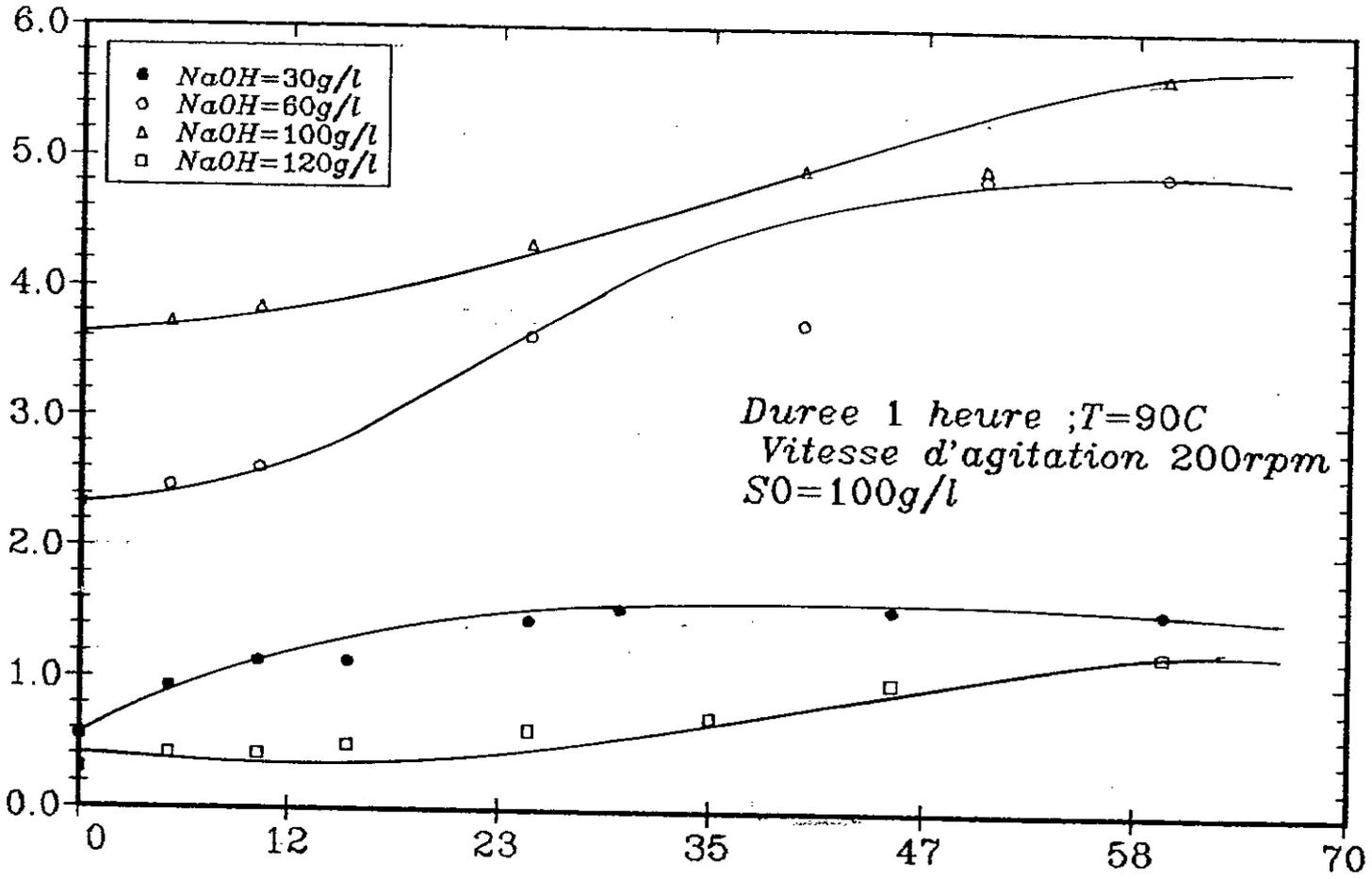
**Tab2.6. [NaOH]= 120 g/l**

| Temps (mn)                         | 0          | 5          | 10         | 15         | 25         | 35         | 45         | 60         |
|------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| g de sucres produit/l              | 0.31       | 0.42       | 0.42       | 0.49       | 0.61       | 0.72       | 0.99       | 1.23       |
| g de sucres produit /g de grignon  | 0.003      | 0.004      | 0.004      | 0.005      | 0.006      | 0.007      | 0.010      | 0.012      |
| g de sucres produit/g de cellulose | 0.008      | 0.011      | 0.011      | 0.013      | 0.016      | 0.018      | 0.028      | 0.032      |
| <b>Rendement</b>                   | <b>0.8</b> | <b>1.1</b> | <b>1.1</b> | <b>1.3</b> | <b>1.6</b> | <b>1.8</b> | <b>2.8</b> | <b>3.2</b> |

Ces résultats sont représentées par la figure 7.1

# Effet du taux de soude

Concentration en sucres totaux g/l



Temps en mn

figure 7.1

-99-

Cette figure (7.1) montre l'évolution de la quantité de sucres totaux produit en fonction du temps, pour les différentes concentrations de soude étudiées. D'après cette dernière, nous constatons que :

Il y a formation instantanée de produits, c'est à dire de sucres totaux, dès que le substrat est introduit dans le becher.

Quelque soit la concentration de soude la vitesse de réaction a tendance à diminuer en fonction du temps jusqu'à ce qu'elle atteigne un palier, correspondant à une vitesse de réaction nulle, il n y a donc plus de formation de sucres.

A partir des résultats obtenues précédemment, nous déterminons pour chaque concentration de soude; le taux maximal de production, de sucres correspondant, qui est définit comme étant

$$T_m (\%) = P/S_o \times 100$$

où

**S<sub>o</sub>**: Quantité de sucres produite en cas d'hydrolyse totale

**P** : Quantité de sucres produite correspondant au palier de la courbe présentant l'évolution de la concentration de sucres produit en fonction du temps

La figure  représente l'évolution du taux maximal de production de sucres en fonction de la concentration, de soude.; D'après l'allure de cette dernière, nous constatons que l'augmentation de la concentration de soude

*Effet de la concentration de soude sur  
le taux de saccharification*

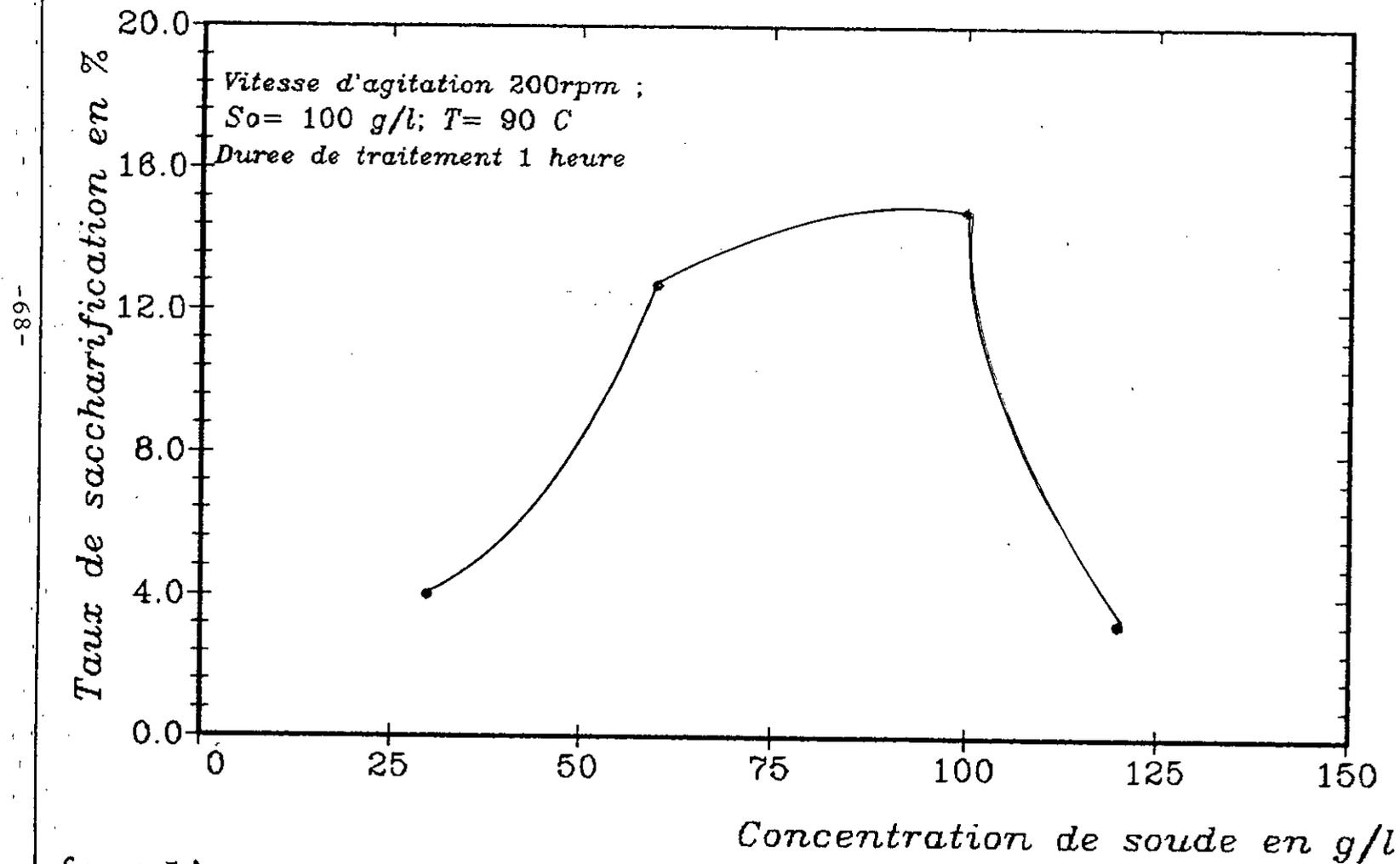


Figure 7.2.

entraîne une augmentation du taux maximal de production de sucres et cela jusqu'à 100 g/l. Au delà, une diminution brutale est observée. La concentration de 100 g/l représente donc la concentration optimale.

**Conclusion:**

*D'après l'étude qui vient d'être faite, concernant le prétraitement à la soude caustique on peut conclure que le prétraitement à la soude caustique donne de meilleurs résultats à la concentration de 100 g/l qui est de ce fait la concentration optimale.*

## B) Effet de la température

Cette étude est réalisée dans le but de déterminer, l'effet de la température sur l'évolution de la concentration. Pour cela, deux températures ont été étudiées, l'une élevée (90°) et l'autre basse (25°C).

Les résultats obtenus sont présentés sur les tableaux 2.7 et 2.8

Tab2.7.  $T^{\circ} = 25^{\circ}\text{C}$

| Temps (mn)                         | 0      | 5     | 10    | 15    | 25    | 50    | 60    |
|------------------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| g de sucres produit/l              | 1.65   | 1.80  | 1.00  | 2.40  | 2.85  | 3.30  | 3.60  |
| g de sucres produit /g de grignon  | 0.0165 | 0.018 | 0.010 | 0.024 | 0.028 | 0.033 | 0.036 |
| g de sucres produit/g de cellulose | 0.043  | 0.046 | 0.026 | 0.062 | 0.074 | 0.086 | 0.093 |
| Rendement                          | 4.3    | 4.6   | 2.6   | 6.2   | 7.4   | 8.6   | 9.3   |

Tab2.8.  $T^{\circ} = 90^{\circ}\text{C}$

| Temps (mn)                         | 0     | 5     | 10    | 25    | 40    | 51    | 60    |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| g de sucres produit/l              | 3.65  | 3.72  | 3.84  | 4.34  | 4.92  | 4.95  | 5.66  |
| g de sucres produit /g de grignon  | 0.036 | 0.037 | 0.038 | 0.043 | 0.049 | 0.049 | 0.056 |
| g de sucres produit/g de cellulose | 0.094 | 0.097 | 0.099 | 0.113 | 0.128 | 0.129 | 0.148 |
| Rendement                          | 9.4   | 9.7   | 9.9   | 11.3  | 12.8  | 12.9  | 14.8  |

Ces résultats sont reportées sur la figure (3).

Cette figure montre l'évolution de la quantité de sucres totaux produit en fonction du temps pour les deux températures étudiées. D'après celle-ci, nous constatons que:

## Effet de la temperature

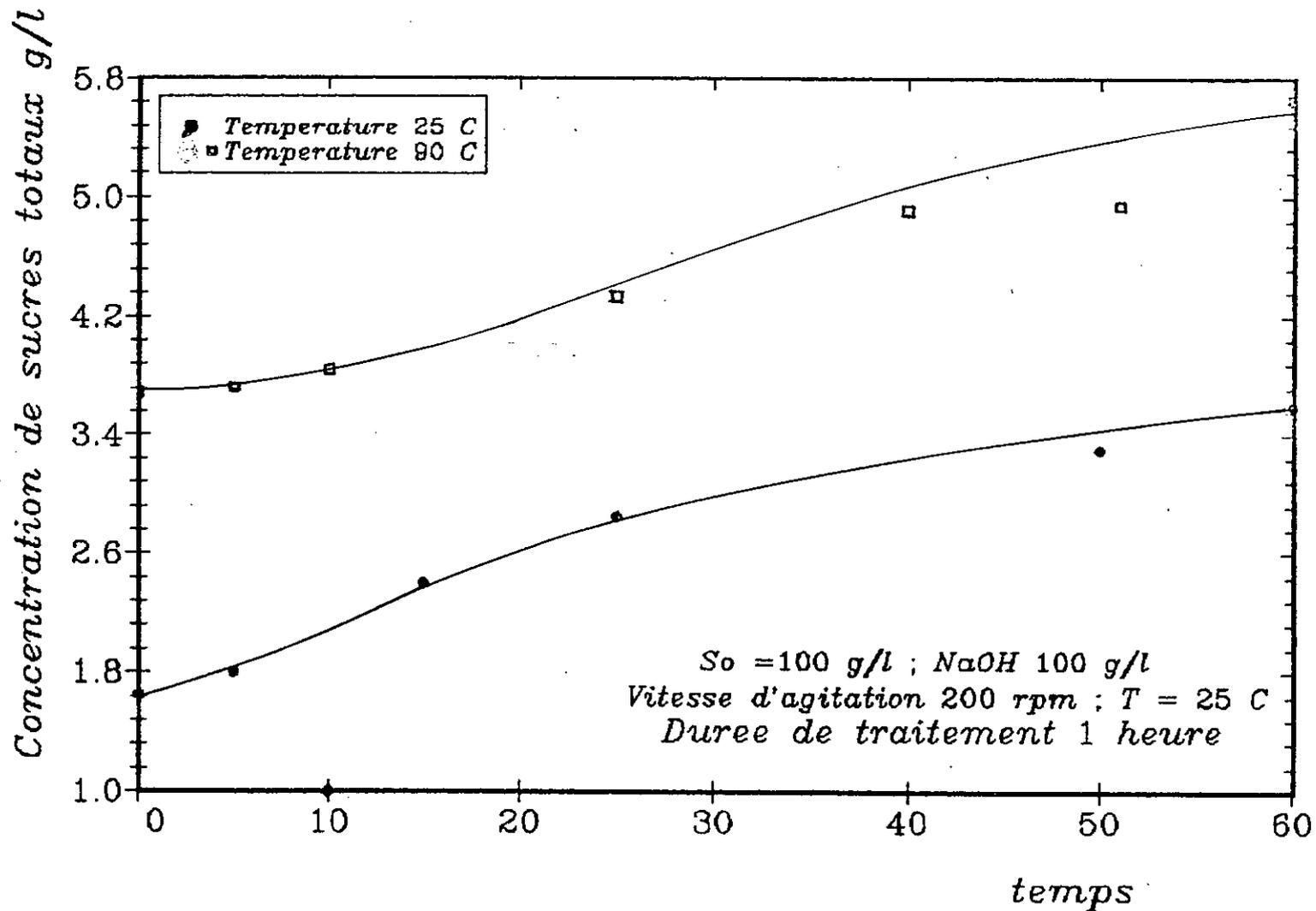


Figure 7.3.

Pour les deux températures, il y a formation instantanée de produit, c'est à dire de sucres totaux dès que le substrat est introduit dans le becher.

L'évolution de la température a une action positive sur la saccharification qui se traduit par un rendement assez élevé à 90 °C comparativement à celui obtenu à 25 °C.

Selon certains auteurs [26], le prétraitement à la soude caustique à température élevée est en fait une combinaison de deux prétraitements physique (température) et chimique ( la soude)

### **Conclusion**

*L'étude qui vient d'être faite concernant l'effet de la température sur l'évolution de la saccharification permet de conclure que la croissance de la température agit positivement sur le rendement de production de sucre lors du prétraitement à la soude caustique.*

**c) Effet de la durée de traitement:**

Cette étude a pour but de déterminer la durée minimale de traitement permettant d'aboutir à un rendement maximal de saccharification. Pour cela nous avons fait varier ce paramètre entre 0 et 2 heures

Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau 2.9

**Tab2.9 .**

| Temps (mn)                                | 0           | 5           | 10          | 25          | 40          |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>g de sucres produit/l</i>              | 3.65        | 3.72        | 3.84        | 4.94        | 4.92        |
| <i>g de sucres produit /g de grignon</i>  | 0.036       | 0.037       | 0.038       | 0.043       | 0.049       |
| <i>g de sucres produit/g de cellulose</i> | 0.094       | 0.097       | 0.099       | 0.113       | 0.128       |
| <b>Rendement</b>                          | <b>9.4</b>  | <b>9.7</b>  | <b>9.9</b>  | <b>11.3</b> | <b>12.8</b> |
| <b>Temps</b>                              | <b>51</b>   | <b>50</b>   | <b>95</b>   | <b>120</b>  |             |
| <i>g de sucres produit/l</i>              | 4.95        | 5.66        | 5.69        | 5.81        |             |
| <i>g de sucres produit /g de grignon</i>  | 0.050       | 0.057       | 0.057       | 0.058       |             |
| <i>g de sucres produit/g de cellulose</i> | 0.129       | 0.148       | 0.148       | 0.151       |             |
| <b>Rendement</b>                          | <b>10.3</b> | <b>14.8</b> | <b>14.8</b> | <b>15.1</b> |             |

Ces résultats sont reportés sur la figure (7) donnant l'évolution de la quantité de sucres produites en fonction du temps de traitement.

D'après cette dernière nous constatons clairement que le temps de traitement de 1 heure est suffisant pour aboutir à la quantité de sucres totaux maximale produite.

# Effet de la duree de traitement

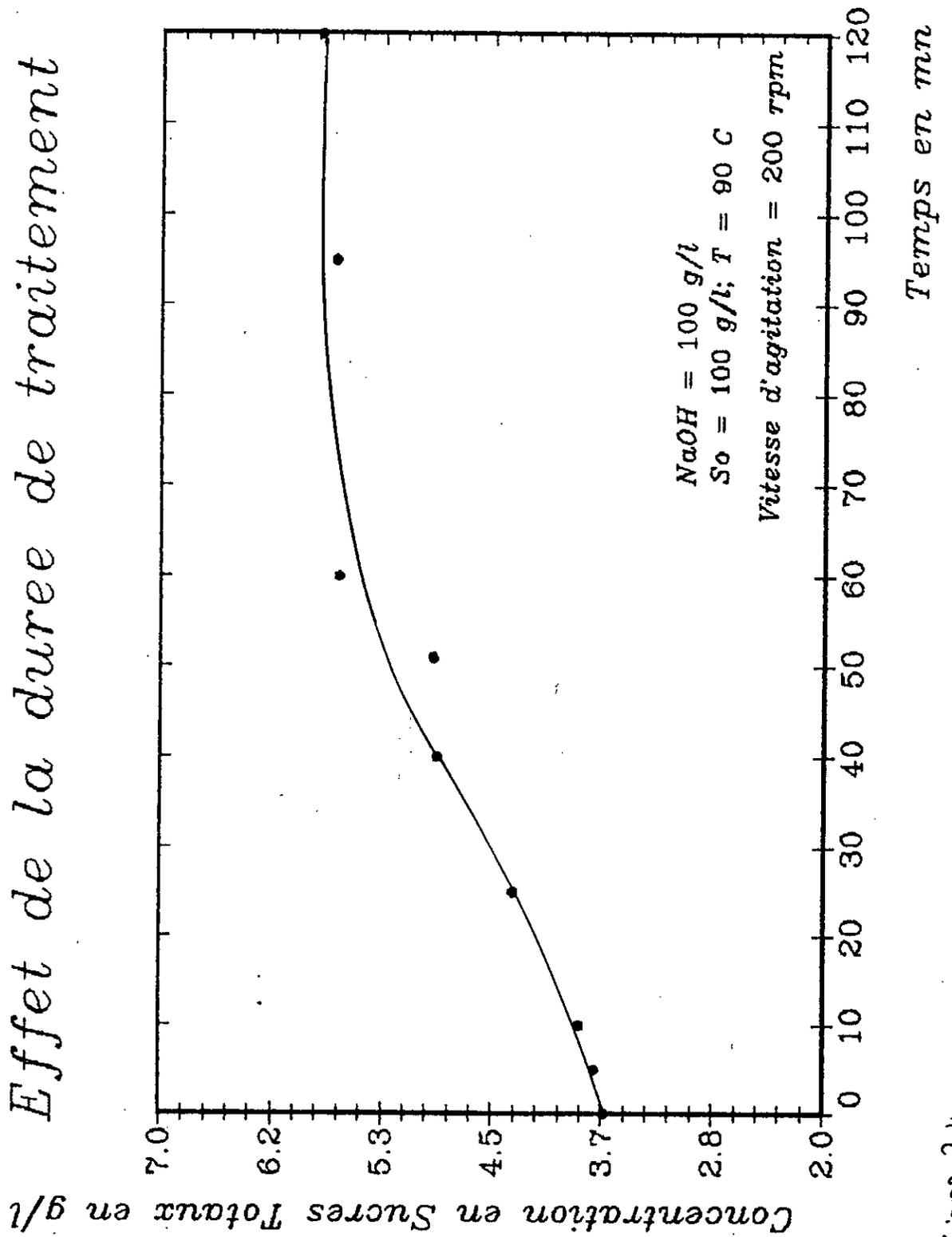


figure 7.4.

Des durées de traitement plus long<sup>ue</sup>s entraînent une légère augmentation du rendement de production de sucres . On peut conclure que la durée de 1 heure est la durée optimale de traitement

Etant donné que la durée de traitement est fonction de la température, de la quantité de soude et de la nature du substrat, ce résultat ne peut être comparé à ceux donnés par d'autres auteurs.

### **Conclusion:**

*Cette étude effectuée en vue de déterminer l'effet des paramètres physico-chimiques sur le prétraitement à la soude caustique permet de conclure qu'une concentration de 100 g/l de soude , une température de 90°C et une durée de traitement de 1 heure permettent d'aboutir au meilleur rendement de saccharification.*

#### II.4.2 Influence du prétraitement à la soude sur la composition chimique du substrat

Cette étude est effectuée dans le but de déterminer l'influence du prétraitement à la soude, réalisé dans les conditions opératoires optimales déterminées précédemment sur la composition chimique du substrat.

Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau 3.1

**Tab1.3 Influence du prétraitement à la soude caustique sur la composition chimique**

|                          | MS    | M.O   | M.G   | C.Ø   | M.A.T | C.T   |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>non traité</i>        | 89.11 | 95.22 | 11.73 | 43.20 | 7.32  | 4.78  |
| <i>traité à la soude</i> | 73.11 | 82.87 | 1.94  | 28.14 | 5.35  | 10.28 |

L'influence de ce traitement sur la composition chimique est importante, particulièrement au niveau des matières grasses, de la cellulose brute et des cendre totales. En effet:

Une diminution de la teneur en matière grasse proportionnelle à la dose de l'agent chimique utilisée est enregistrée. La teneur qui était de 11.73 % chute à 1.94 % suite à ce prétraitement.

L'effet de ce traitement se traduit également par une élévation de la teneur en matière minérales. La teneur qui était de 4.78 % passe à 10.28 % de la matière sèche. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par d'autres auteurs [23].

Une baisse importante de la teneur en cellulose brute est aussi enregistrée, c'est cette fraction qui a été convertie en sucres.

**Conclusion :**

*L'étude concernant l'influence du prétraitement à la soude sur la composition chimique nous permet de constater que ce traitement entraîne des modifications de la composition chimique essentiellement une diminution de la teneur <sup>en cellulose</sup> brute qui a été convertie en sucres.*

### III.4.4.3 Hydrolyse enzymatique

Cette étude est réalisée dans le but de déterminer la cinétique de l'hydrolyse enzymatique.

Pour mener à bien cette cinétique, il a fallu d'abord déterminer la quantité d'enzyme permettant d'aboutir au meilleur rendement de saccharification. Pour cela trois concentrations ont été testées

Les résultats obtenus sont présentés sur les tableaux suivants 4.1-4.2-4.3

Tab. 4.1  $[E] = 1 \text{ g/l}$

| Temps | g/de sucres produit/l | g/de sucres produit/ g de grignon | g/de sucres produit/g de cellulose | Rendement %     |
|-------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| 0     | 3.17                  | 0.082                             | 0.290                              | 29              |
| 2     | 4.17                  | 0.093                             | 0.330                              | 33              |
| 5     | 4.51                  | 0.100                             | 0.355                              | 35.5            |
| 8     | 3.66                  | 0.080                             | 0.284                              | 28.4            |
| 10    | 4.11                  | 0.091                             | 0.323                              | 32.3            |
| 15    | 3.55                  | 0.080                             | 0.284                              | 28.4            |
| 22    | 3.95                  | 0.088                             | 0.313                              | 31.3            |
| 30    | 2.62                  | 0.058                             | 0.206                              | <del>20.6</del> |
| 40    | 3.91                  | 0.087                             | 0.309                              | 30.9            |
| 50    | 4.00                  | 0.088                             | 0.313                              | 31.3            |
| 70    | 3.97                  | 0.088                             | 0.313                              | 31.3            |
| 80    | 4.02                  | 0.089                             | 0.318                              | 31.8            |
| 90    | 3.77                  | 0.084                             | 0.298                              | 29.8            |
| 120   | 1.51                  | 0.034                             | 0.121                              | 12.1            |
| 240   | 6.68                  | 0.149                             | 0.528                              | 52.8            |
| 300   | 5.91                  | 0.131                             | 0.467                              | 46.7            |

Rendement maximal = Rendement du prétraitement + Rendement d'hydrolyse

$$R\% = 14.8 + 52.8 = 67.6$$

Tab. 4.2.  $[\eta] = 1.5 \text{ g/l}$

| Temps | g/de sucres produit/l | g/de sucres produit/ g de grignon | g/de sucres produit/g de cellulose | Rendement % |
|-------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------|
| 0     | 5.38                  | 0.12                              | 0.425                              | 42.5        |
| 2     | 4.37                  | 0.084                             | 0.346                              | 34.6        |
| 8     | 3.91                  | 0.087                             | 0.309                              | 30.9        |
| 10    | 5.02                  | 0.112                             | 0.397                              | 39.7        |
| 15    | 4.60                  | 0.102                             | 0.363                              | 36.3        |
| 20    | 6.31                  | 0.140                             | 0.498                              | 49.8        |
| 30    | 4.82                  | 0.140                             | 0.380                              | 38.0        |
| 40    | 3.77                  | 0.080                             | 0.298                              | 29.8        |
| 60    | 4.75                  | 0.109                             | 0.374                              | 37.4        |
| 90    | 6.64                  | 0.149                             | 0.524                              | 52.4        |
| 150   | 6.88                  | 0.153                             | 0.544                              | 54.4        |
| 180   | 5.22                  | 0.110                             | 0.412                              | 41.2        |
| 210   | 5.00                  | 0.111                             | 0.395                              | 39.5        |
| 240   | 6.20                  | 0.138                             | 0.490                              | 49.0        |
| 270   | 7.44                  | 0.165                             | 0.587                              | 58.7        |
| 300   | 4.78                  | 0.102                             | 0.360                              | 36.         |

$$R\% = 14.8 + 58.7 = 73.5\%$$

4.3.  
Tabl. 4.3 = 2 g/l

| Temps | g/de sucres produit/l | g/de sucres produit/ g de grignon | g/de sucres produit/g de cellulose | Rendement % |
|-------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------|
| 0     | 5.53                  | 0.123                             | 0.44                               | 44.0        |
| 15    | 3.75                  | 0.083                             | 0.295                              | 29.0        |
| 35    | 5.60                  | 0.124                             | 0.444                              | 44.4        |
| 60    | 5.22                  | 0.116                             | 0.412                              | 41.2        |
| 120   | 2.66                  | 0.059                             | 0.210                              | 21.0        |
| 180   | 6.93                  | 0.154                             | 0.547                              | 54.7        |
| 240   | 5.75                  | 0.127                             | 0.454                              | 45.4        |
| 300   | 5.75                  | 0.127                             | 0.454                              | 45.4        |

$$R\% = 54.7 + 14.8 = 69.5\%$$

Ces résultats sont reportées sur les figures : 7.5 , 7.6 - 7.7 .

A partir de ces figures, nous constatons que:

Quelque soit la concentration d'enzyme ; il y a formation instantanée de sucres dès que celle ci est introduite dans le becher .

Une concentration d'environ 1,5 g/l du mélange commercial de cellulase donnerait le rendement le plus élevé et ceci dans nos conditions opératoires.

L'allure des courbes présentent l'évolution de la concentration des sucres produit en fonction du temps montre que la cinétique de l'hydrolyse enzymatique est hétérogène, elle ne suit par la relation de Michaelis et Menten.

*Influence de la concentration d'enzyme sur la cinétique d'hydrolyse du grignon d'olive par la cellulase CT*

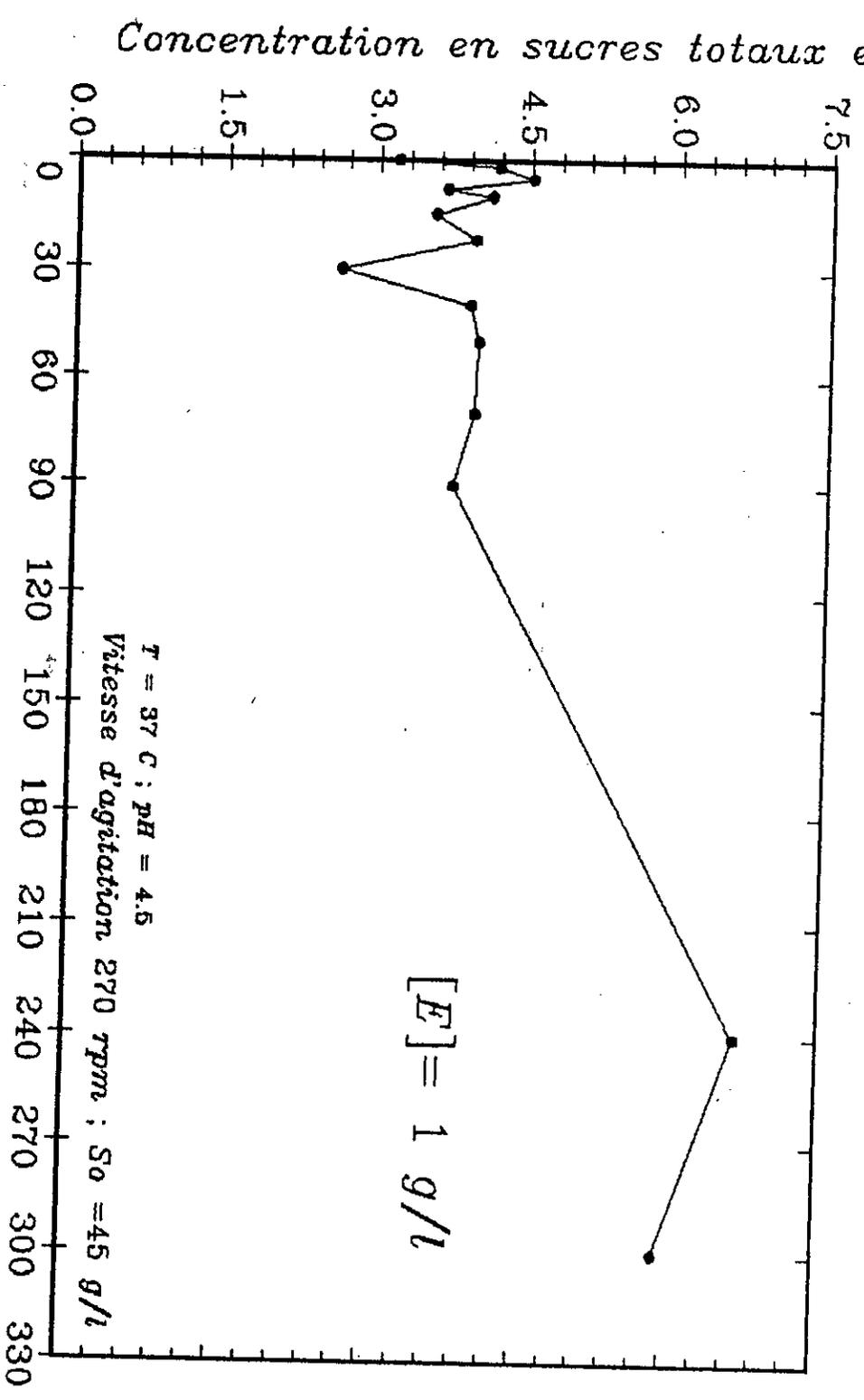


Figure 4.5

*Influence de la concentration d'enzyme sur la cinétique d'hydrolyse du grignon d'olive par la cellulase CT*

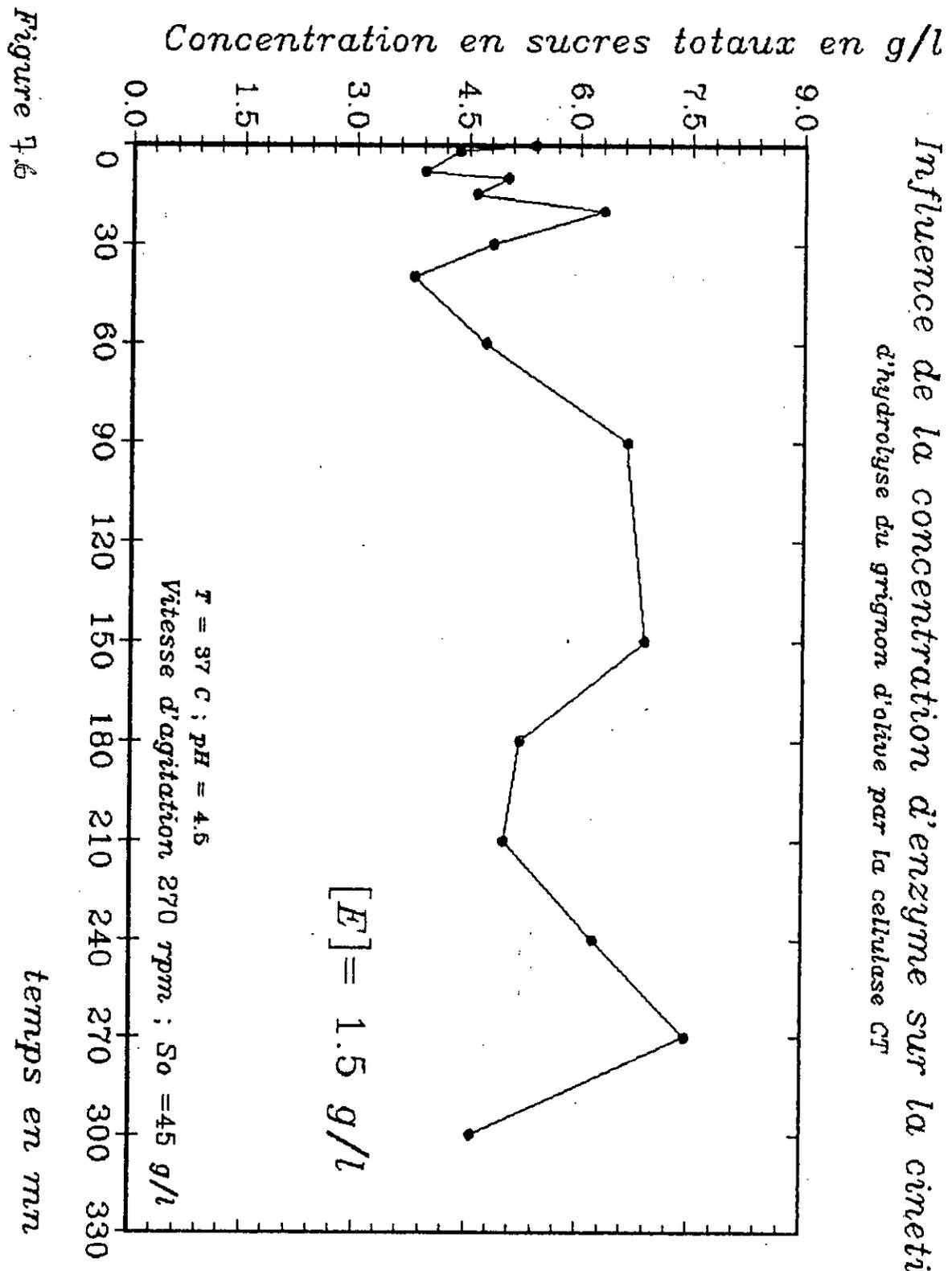


Figure 7.6

*Influence de la concentration d'enzyme sur la cinétique  
d'hydrolyse du grignon d'olive par la cellulase CT*

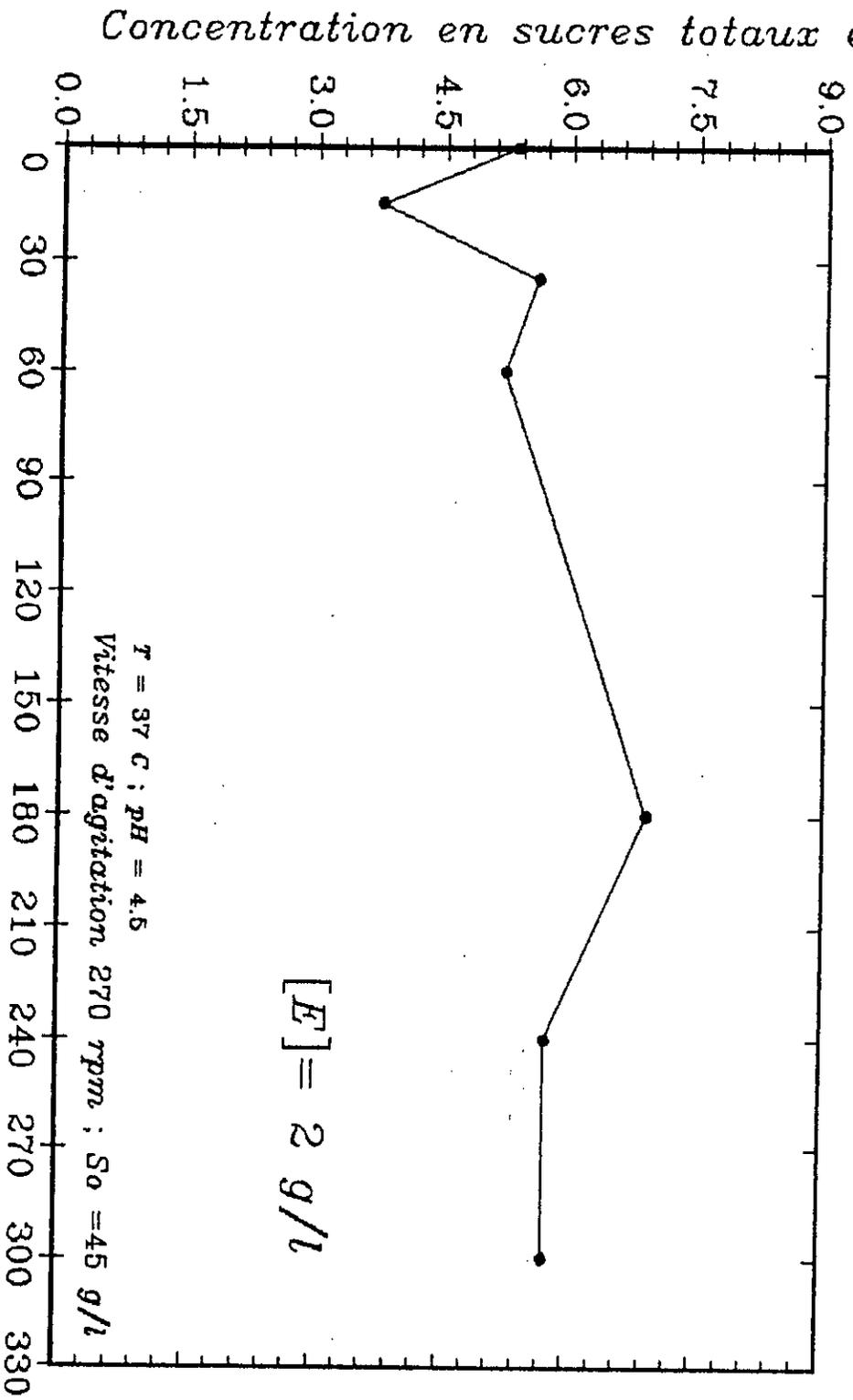


Figure 4.4

Ceci résulte du fait que la cellulose est un substrat insoluble alors que la cinétique <sup>michaélienne</sup> ne s'applique qu'à des systèmes en solution.

Le même type d'allure a été trouvée par F. Boussaid [22] lors de l'hydrolyse enzymatique de la paille de blé, elle <sup>est</sup> liée à plusieurs facteurs

- Hétérogénéité du substrat
- Inhibition par les produits de la réaction particulièrement le glucose et le cellobiose
- L'inactivation thermique et l'adsorption irréversible d'une partie d'enzymes sur le substrat.

Par ailleurs; l'allure d'une cinétique michaelienne avec inhibition non compétitive a été trouvée par certains auteurs [24]. [27].

## Conclusion

*L'étude concernant, la cinétique de l'hydrolyse enzymatique du grignon d'olive, nous permet de conclure que*

- *la cinétique de l'hydrolyse est hétérogène, elle n'obéit pas loi de Michaelis-Menten*
- *La concentration optimale d'enzyme est de 1.5 g/l pour les conditions opératoires réalisées.*

### III.4.4 Hydrolyse acide

L'étude est réalisée dans le but de suivre la cinétique de l'hydrolyse acide du grignon d'olive à l'acide sulfurique  $H_2SO_4$  à 30% à une température de  $100^\circ C$  durant cinq heures

Les résultats obtenus sont représentés sur le tableau 5.4.

| Temps | g/de sucres produit/l | g/de sucres produit/ g de grignon | g/de sucres produit/g de cellulose | Rendement % |
|-------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------|
| 0     | 0.233                 | 0.023                             | 0.06                               | 6.0         |
| 5     | 0.272                 | 0.027                             | 0.071                              | 7.1         |
| 10    | 0.277                 | 0.028                             | 0.072                              | 7.2         |
| 25    | 0.477                 | 0.048                             | 0.122                              | 12.2        |
| 30    | 1.394                 | 0.139                             | 0.362                              | 36.2        |
| 45    | 0.327                 | 0.033                             | 0.085                              | 8.5         |
| 60    | 1.077                 | 0.108                             | 0.281                              | 28.1        |
| 75    | 1.077                 | 0.108                             | 0.281                              | 28.1        |
| 95    | 1.788                 | 0.179                             | 0.465                              | 46.5        |
| 105   | 1.92                  | 0.192                             | 0.498                              | 49.8        |
| 135   | 2.14                  | 0.214                             | 0.555                              | 55.5        |
| 165   | 2.28                  | 0.228                             | 0.594                              | 59.4        |
| 225   | 2.027                 | 0.203                             | 0.526                              | 52.6        |
| 255   | 2.027                 | 0.227                             | 0.59                               | 59          |
| 300   | 2.272                 | 0.227                             | 0.59                               | 59          |

Ces résultats sont reportées sur la figure (79)

### Hydrolyse Acide du grignon d'olives

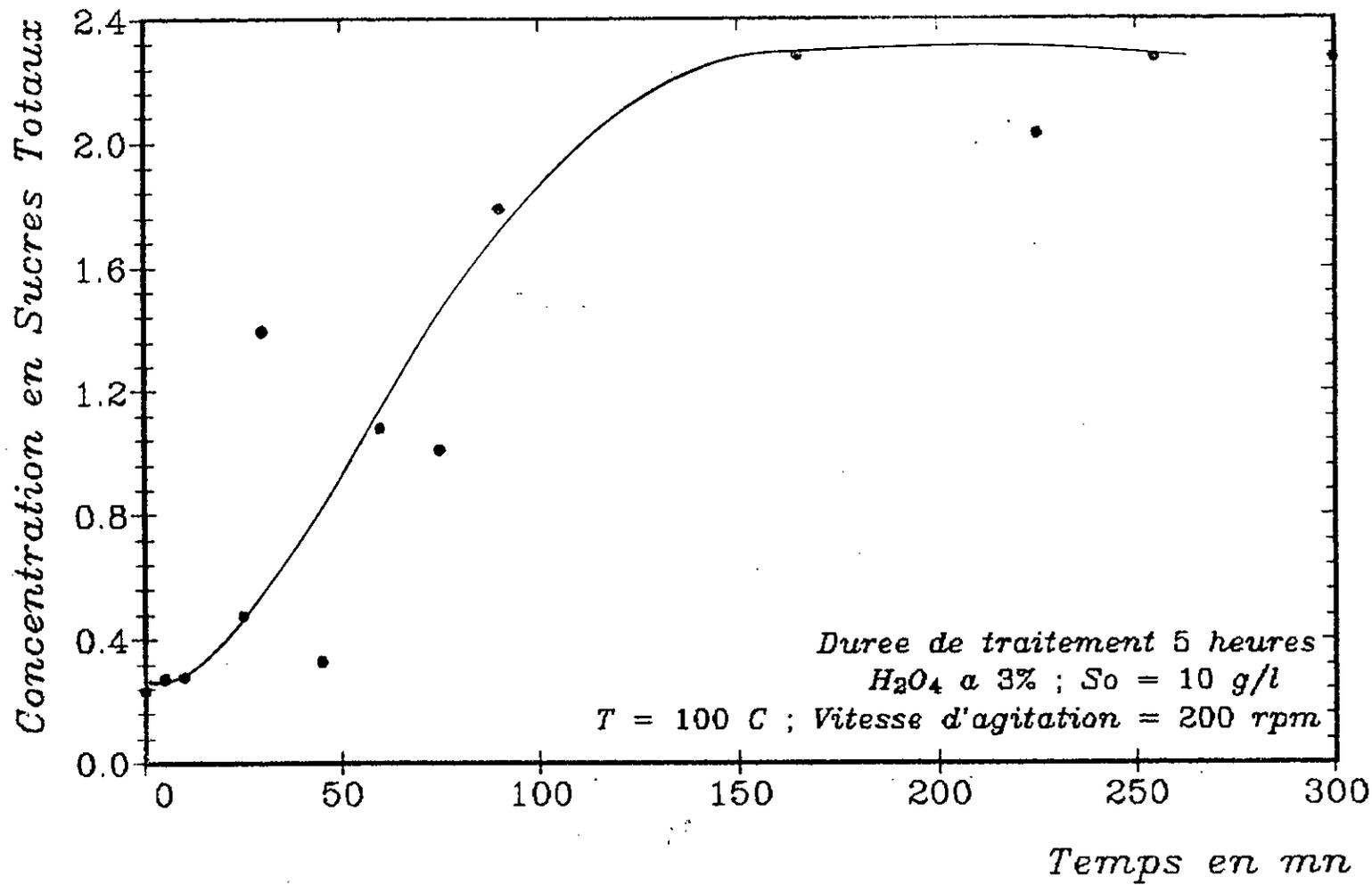


Figure : 7.8.

Cette figure montre l'évolution de la production de sucres en fonction du temps. D'après cette dernière nous constatons que :

- Il y a formation instantanée de sucres dès que le substrat est introduit dans l'eren
- Au cours de la première heure de réaction, l'hydrolyse est incomplète vue la faible durée de chauffage, elle se traduit par un faible rendement de saccharification.
- Le rendement maximal de production de sucre<sup>est</sup> atteint au bout de 3 heures de réaction
- Le rendement de saccharification obtenu est assez élevé (59%) toutefois des rendements élevés peuvent être obtenus en travaillant à des conditions opératoires qui limitent la dégradation des sucres produits en substances indésirables.

# CONCLUSION GENERALE

## CONCLUSION

Notre travail a porté sur la caractérisation et le traitement d'un rejet d'huilerie le grignon d'olive dans le but d'une saccharification.

A l'issue de cette étude, nous avons dégagé un certain nombre de conclusions dont les plus importantes sont:

Le grignon brut étudié est caractérisé par une forte teneur en cellulose brute qui constitue l'objectif essentiel de tout procédé d'hydrolyse

Le prétraitement à la soude caustique du grignon brut aboutit à un bon rendement de saccharification dans les conditions opératoires suivantes:

- Un taux de soude de 10%
- Une température de 90°C
- Une durée de traitement *de 1 heure.*

Le prétraitement à la soude caustique entraîne des modifications importantes de la composition chimique, l'épuisement par solvant des matières grasses avant traitement est souhaitable.

La fraction perdue de cellulose brute correspond à celle convertie en sucres fermentescibles;

Cependant, l'utilisation de ce prétraitement diminue de part la pollution qu'il engendre.

L'hydrolyse enzymatique du grignon brut prétraité à la soude caustique aboutit au meilleur rendement de saccharification pour une concentration d'enzyme de 1.5 g/l

Pour améliorer ce rendement, plusieurs variables peuvent être prises en considération

- Une ou plusieurs additions de substrat
- Une ou plusieurs additions d'Enzyme.

L'utilisation de la technologie membranaire en combinaison avec l'hydrolyse enzymatique semble être intéressante, comme l'ultrafiltration pour la séparation des sucres de l'enzyme

La cinétique de l'hydrolyse enzymatique ne suit pas la loi de Michaelis. La cinétique hétérogène obtenue est liée à la nature de ce substrat complexe.

L'hydrolyse acide du grignon d'olive mène à la production du sucre avec un rendement assez élevé, mais qui est faible comparé à celui obtenu par hydrolyse enzymatique. Toutefois et du fait des problèmes de pollution induite par ce processus, son utilisation est peu souhaitable.

En tout état de cause, pour le moment et probablement encore pour une longue période, la valorisation du grignon d'olive en sucres fermentescibles ne pourra s'effectuer dans le cadre d'un schéma général, néanmoins, nous recommandons vivement à nos chercheurs et lobotaoires de se pencher sur les différents procédés de valorisation du grignon d'olive et plus principalement sur le procédé d'hydrolyse enzymatique qu'ils avèrent intéressante des deux points de vue économiques et environnemental.

# ANNEXES

## DOSAGES DES PROTEINES

### DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL

Le pourcentage de l'azote total se calcule par la méthode de Kjeldhal

#### *a) Minéralisation*

La prise d'essai est de 2 g , on ajoute de catalyseur puis 10 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrée ou minéralisée par ébullition en chauffant d'abord doucement avec l'agitation, jusqu'à décoloration, poursuivre alors le chauffage pendant 2 heures

#### *b) Distillation*

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

Verser le contenu du matra dans le réservoir de distillation ajouter quelques gouttes de phenolphtaleine

Ouvrir le robinet puis rincer le réservoir

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

Ouvrir le robinet de vapeur et distiller pendent 5 mn

enlever l'erlenmeyer et rincer l'extrémité du réfrigérant

#### *c) Le titrage*

Titrer avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (N/50) jusqu'à coloration rose mauve le pourcentage de l'azote total est calculée par la formule suivante

$$\% \text{ d'azote total} = \frac{dV \cdot 0.25}{Pe \cdot 1000} \cdot 100$$

V volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (N/50) ajouté (ml)

Pe ; prise d'essai (g)

D densité de l'échantillon à doser

Le pourcentage de protéine par la formule suivante

$$\% \text{ de protéine} = \% \text{ d'azote total} \cdot 6,25.$$

## Dosage des sucres totaux

### Méthode de Dubois 1956

La méthode utilisée pour le dosage des glucides est celle du Dubois 1956 qui consiste à doser les pentoses et les hexoses en utilisant du phénol en présence d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ )

Les solutions glucidiques en présence de ce réactif se colorant en jaune dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des glucides et la densité optique est déterminée 4 485 pour les pentoses et 490 pour les hexoses

#### 1.1 réactifs

$H_2SO_4$  concentré

Solution de phénol à 5 %

Tube à essai

pipette de 5 ml

Spectromètre

#### 1.2 Préparation de la courbe d'étalonnage

Solution mère

100 mg de glucose déshydratée dans 100 ml d'eau distillée prendre 4 ml de la solution mère et diluer à 50 ml dans une fiole à jaugee (1 ml contenait 50 microgrammes)

Préparer des tubes à essai qui contiennent 0.1, 0.2 0.3 0.4 0.5 , 0.6 0.7 , 0.8 ml de la solution / 50 ml , correspondant aux concentrations suivantes 8-16-24-32-40-48-56-64 microgrammes

Compléter le volume des tubes à essai à 1 ml

Additionner 1 ml des tubes à essai Additionner 1 ml de la solution phénol concentrée Agiter les tubes et laisser refroidir à la température ambiante pendant 30minutes

Lire la densité optique à 492 nm

### Courbe d'étalonnage

|                        |       |       |      |      |      |    |      |      |
|------------------------|-------|-------|------|------|------|----|------|------|
| n° de tube             | 1     | 2     | 3    | 4    | 5    | 6  | 7    | 8    |
| [ ] en $\mu\text{g/l}$ | 8     | 16    | 24   | 32   | 40   | 48 | 56   | 64   |
| DO                     | 0.166 | 0.195 | 2.33 | 2.82 | .379 | .4 | .425 | .586 |

## Erreurs de frappe

Page 55 : paragraphe III - 1.4.2 - en mode opératoire  
5<sup>ème</sup> étape :

Après avoir fixé tous les paramètres opératoires,  
introduire la quantité de soude préalablement pesée  
dans le becher à un temps initial  $t_0$ .

Page 56 : Paragraphe III - 1.5.1 :

Pour mener à bien notre cinétique, il a fallu d'abord  
déterminer la quantité d'enzyme permettant d'aboutir  
au meilleur rendement de saccharification. Pour cela,  
nous avons testé différentes concentrations en cellulase  
sur une masse de grignons prétraitée à la soude caustique  
à 10% pendant une heure.

# BIBLIOGRAPHIE

- 1 **R.Scirban**  
« Biotechnologie », 1984
- 2 **A. Mourache et C.L. Costes**  
« Hydrolases et dépolymérasés , enzymes d'intérêts industriels »  
édition Gauthier -Villars Bordas 1985
- 3 **B. Monties**  
« Les polymères végétaux » édition Gauthier-Villards , Bordas 1980
- 4 **A. Nefzaoui**  
« Valorisation des résidus ligno-cellulosique dans l'alimentaion des ruminants par les traitements aux alcalis . Application aux grignons d'olive » Thèse de Doctorat 1985.
- 5 **M.S. Benhabyles**  
« Hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonneries »  
Thèse de Magister 1992
- 6 **Talantikit**  
Projet de fin d'Etudes 1983
- 7 **C.L. Audigié et G. Dupont**  
« Principes des méthodes d'analyse » édition Doin 1985
- 8 **U. Pallota et P. Capena**  
« Les sous produits de l'industrie oléicole, et leurs utilisation »  
Séminaire oléicole international FAO 1967
- 9 **S. OUAMANE**  
« Hydrolyse enzymatique du cruor par la papaine » PFE 1994
- 10 **P.E. Pilet**  
« Les parois cellulaires » Edition Masson ,1967

- 11 **P.Ducroo**  
« Utilisation industrielle des enzymes »  
Ind. Aliment. Agric; 1982
- 12 **J.P Wolf et A Karleskind**  
« Manuel des corps gras » T1  
éditeur technique et documentation Lavoisier 1992
- 13 **R.François**  
« Les industries des corps gras »  
éditeur Technique et Documentation Genève 1974
- 14 **F Benbessi et S. Bertal**  
« Contribution aux traitement des rejets liquides des huileries d'olives  
par ultrafiltration » PFE.1994
- 15 **D Sabourault et A.M. Boudeaux**  
« Biochimie » éditeur Harman 1974
- 16 **C. Costes**  
« élément de biochimie structurale » édition Dunod , Université de  
Paris 1978
- 17 **D. Mameri**  
Cours de biochimie ,1993
- 18 **P Tranbouze**  
« Les réacteurs chimique » édition , *technique et documentation.*
- 19 **Revue Biofutur**  
« structure et fonction des enzymes « 1969
- 20 **L Belkacem**  
« Valorisation et traitement des rejets des huileries en Algérie »  
Séminaire 1992

- 21 **Villermaux**  
Génie de la réaction chimique
- 22 **F. Boussaid**  
« étude la dénitrification in situ à l'aide de substrat cellulosesiques » Thèse de doctorat 1985
- 23 **A. Marabet**  
« Influence d'un traitement chimique ( NaOH ou Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) sur la composition chimique et la digestabilité in vitro d'un résidu lignocellulosiques « grignon d'olive » PFE 1984
- 24 **D.J Fiox et P. Gray**  
« Comparaison of alcali and steam acid prétraitement of lignocellulois materiels to increase enzymatic succptibelly Evaluation under optimised preteament conditions » 1989
- 25 **J.E. Courtais et B.K. Diep**  
« Recherche sur le dosage des cellulases et hémicellulases dans les préparations pharmaceutiques » 1967
- 26 **M.Gharpuray et L.T Fan**  
« Structura modification of lignocellosics by présentement to enhance enzymatic hydrolisis » 1984
- 27 **L. Vallander et K/E/L Ericksen**  
« Production of ethanol from cellulosesics materiels »
- 28 **H. Thomas et F. Charles**  
« Technologies Advances for continuous compression Milling pretreatment of lignocellulosique for enzymatic »
- 29 **J.Woley et S.Inc**  
« Symposium on fuels chemicals biomass 1983

- 30 **J. Loiseleur**  
« Techniques de laboratoires » Edition **Masson 1963.**
- 31 **A.V Gustakov et P.Smitsyn**  
« Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulase, a mathematical model for a batch reactor process » 1984
- 32 **H.S Shin et D.Y. Ryu Deney**  
« Adsorption of cellulose » 1982
- 33 **C.Vaccarino et G/ Lagana**  
« Amélioration de la valeur nutritionnelle des grignons d'olives par un traitement au carbonate »
- 34 **L. Vallabnder et K.E Ericson**  
Enzymatic saccharification of pretreated wheat straw 1983