

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Ecole Nationale Polytechnique

Département de Génie de l'Environnement

Laboratoire des Biotechnologies

Thèse de Magister

En Génie de l'Environnement

Option : Biotechnologie

Présentée par

HALET FARIDA née HAMDACHE

THEME

Hydrolyse enzymatique des grignons d'olive

Soutenue devant le Jury :

Présidente	M ^{me} N. BELHANECHÉ	<i>Maître de Conférences</i>	ENP
Rapporteur	M ^r N. MAMERI	<i>Professeur</i>	ENP
Examineurs	M ^r M. BELLAL	<i>Maître de Conférences</i>	INA
	M ^{me} K. MOUSSAOUI	<i>Maître de Conférences</i>	ENP
	M ^r H. GRIB	<i>Charge de Cours</i>	ENP
	M ^r B. NEDJMI	<i>Maître de Conférences</i>	ENS

ملخص :

الهدف من هذا العمل هو دراسة الاماحة الانزيمية للنفايات الناتجة عن العاج زيت الزيتون .

قمنا في البداية بتعيين المحتوى الكيميائي لهذه النفايات، ودراسة تأثير العوامل الكيميائية و الفيزيائية على معالجتها بالصدود، ثم اعممنا بدراسة المفاعل الانزيمي في مفاعل بيولوجي باسلوب غير متواصل، و في مفاعل بيولوجي باسلوب متواصل، متصل بتقنية غشائية مافوق التصفية.

الكلمات الجوهرية :

إماعة انزيمية ، لينوسيليلوز ، النفايات الصلبة لزيت الزيتون، مفاعل بيولوجي ، تقنية ما فوق التصفية.

Resumé :

Le but de ce travail est l'étude de l'hydrolyse enzymatique d'un matériau lignocellulosique : grignon d'olive.

La caractérisation chimique du grignon d'olive a été déterminée et l'influence des paramètres physico-chimiques sur le prétraitement alcalin de ces grignons a été étudiée.

Les performances du processus d'hydrolyse enzymatique dans un réacteur discontinu et dans un réacteur continu couplé à l'ultrafiltration ont été également étudiées et optimisées.

Mots clés : hydrolyse enzymatique, lignocellulose, grignon d'olive, cellulase, bioréacteur à membrane.

Abstract :

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

The chemical characterisation and the influence of physical and chemical parameters on the pretreatment with NaOH of these residues have been studied.

The performances of the enzymatic reaction in a discontinuous reactor and in a continuous reactor coupled with ultrafiltration have been studied .

Key words : enzymatic hydrolysis, lignocellulose, olive-oil cake, cellulase, membrane bioreactor.

Dedicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents qui m'ont appris à aimer le savoir

A mon mari et mon fils Abd el Djalil qui m'ont appris à aimer la vie.

A mes sœurs, mes frères, mes belles sœurs, mes beaux frères, mes nièces et mes neveux qui m'ont tous soutenu avec leur amour tout au long de mon travail

A toutes mes amies.

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude à tous ceux qui m'ont aidé à réaliser cette étude.

Je tiens à remercier Mr N.MAMERI directeur du laboratoire des biotechnologies pour avoir accepté de diriger ce travail, Ses conseils et son temps ont été très précieux pour la réalisation de cette recherche faite dans des conditions très difficiles, Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude.

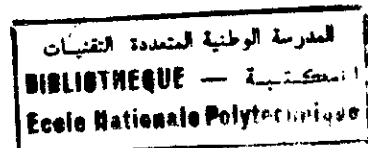
Je tiens à remercier M^{me} BELHANECHÉ, pour avoir accepté de présider le jury.

Mes remerciements vont également à M^{me} MOUSSAOUI, Mr GRIBI, Mr BELLAL et Mr NEDJMI d'avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens à remercier tous les enseignants qui ont participé à ma formation, ainsi qu'à tous mes collègues de laboratoire qui m'ont toujours soutenu dans les moments difficiles.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Mahfoud pour toute son aide.

Sommaire



Introduction

1

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur l'olive et ses sous-produits	3
Chapitre 2 : Les résidus lignocellulosiques (composition et structure)	13
Chapitre 3 : Les prétraitements	21
Chapitre 4 : L'hydrolyse enzymatique des résidus lignocellulosiques	26
Chapitre 5 : L'ultrafiltration	39

Partie expérimentale

Chapitre 6 : Caractérisation et prétraitements des grignons d'olive	47
Chapitre 7 : Etude de l'hydrolyse enzymatique des grignons d'olive dans un réacteur discontinu	55
Chapitre 8 : Etude de l'hydrolyse enzymatique des grignons d'olive dans un réacteur continu couplé à l'ultrafiltration	76

Conclusion

99

Bibliographie

Annexes

Introduction

Aucun végétal, aucun arbre n'a autant été chanté, loué, sacré, béni que l'olivier. Même si les historiens ne nous ont pas encore précisé le lieu de naissance de l'olivier, ils sont toujours d'accord pour lui attribuer une aire d'origine : La Méditerranée orientale, Asie mineure, vallée de Jourdain ou du Nil [1].

Arbre typique des régions sèches et chaudes, l'olivier constitue une composante familière des pays du bassin méditerranéen et représente pour beaucoup d'entre eux, une des principales cultures traditionnelles [1].

La diminution des ressources en fuels et la croissance de leur demande ont mené à la recherche d'une ressource d'énergie alternative. La biomasse lignocellulosique constituée par des résidus agricoles (pailles de blé, bagasse, grignons d'olive) et forestiers (fourrages et bois non exploités), offre des perspectives intéressantes, elle représente une source d'énergie renouvelable et rapidement disponible.

Depuis l'empire Romain, le noyau et le grignon d'olive séché, sont des combustibles appréciés, plus tard, la pulpe de grignon vidée de son huile est convertie en nourriture pour les ruminants et en amendement organique.

Par ailleurs, la valorisation des grignons d'olive comme biomasse lignocellulosique dans la production de sucres fermentescibles et leur bioconversion semble être une alternative intéressante. En effet, la cellulose, constituant majeur de cette biomasse et substance fondamentale des tissus végétaux peut être valorisée en tant que polymère dans l'industrie des dérivés de la cellulose, ou bien après hydrolyse chimique ou enzymatique, fournit du glucose qui constitue une matière première importante dans l'industrie chimique.

Les hémicelluloses étant également un constituant assez important des grignons d'olives, leur hydrolyse fournit des sucres autres que le glucose et qui sont transformables en alcools.

En Algérie, pour des raisons techniques et surtout économiques, la biomasse lignocellulosique, mis à part son utilisation dans l'alimentation des ruminants, ne fait l'objet d'aucune valorisation.

C'est dans ce cadre que vient s'inscrire notre travail; il a été question d'essayer de valoriser un sous-produit issu de l'industrie oléicole (grignon d'olive) par hydrolyse enzymatique pour la production de sucres. Les travaux de recherche ont particulièrement porté sur l'optimisation de ce procédé réalisé selon deux modes différents : mode discontinu et mode continu couplé à un procédé membranaire.

Cette étude a été développée en deux grandes parties :

Une partie bibliographique, où nous avons défini la biomasse lignocellulosique.

Une partie expérimentale, subdivisée en trois volets :

Dans un premier volet, nous nous sommes intéressés à la caractérisation chimique des grignons d'olive et leurs prétraitements.

Dans le second, nous avons essayé d'optimiser les paramètres physico-chimiques qui influent sur le processus d'hydrolyse enzymatique réalisé en réacteur discontinu.

Enfin, le dernier volet est consacré à l'étude de l'hydrolyse enzymatique dans un bioréacteur continu couplé à un procédé membranaire : l'ultrafiltration.

Partie Bibliographique

Chapitre I

Généralités sur l'olive et ses sous-produits

I-1/ Origine et production :	4
I-2/ L'oléiculture et la production oléicole en algérie :	4
I-3/ Technologie de production d'huile d'olive :	6
I-4/ Composition de l'olive :	7
I-5/ Définition des sous-produits de l'oléiculture :	7
I-6/ Composition chimique des grignons d'olive :	9
I-7/ Estimation quantitative des rejets d'huilerie d'olive :	11

Généralités sur l'olive et ses sous-produits

I-1/ Origine et production :

L'histoire de l'olivier se confond avec celle des civilisations qui ont connu le jour dans le bassin méditerranéen. Son origine se situe en Asie mineure où il est très abondant et forme de véritables forêts [2].

L'importance de la production oléicole mondiale peut être illustrée par les 600 millions d'arbres qui occupent 7 millions d'hectares et produisent annuellement 8,4 millions de tonnes d'olives [2].

Les pays les plus producteurs et les plus consommateurs sont l'Italie, l'Espagne et la Grèce qui gouvernent environ 80% de la production mondiale [3].

Le tableau 1, donne la répartition de la production oléicole entre les trois pays :

Espagne	32% de la production mondiale
	41% de la production Européenne
Italie	28% de la production mondiale
	35% de la production Européenne
Grèce	17% de la production mondiale
	21% de la production Européenne

Tableau 1 : Répartition de la production oléicole [3].

I-2/ L'oléiculture et la production oléicole en Algérie :

L'Algérie, un des pays producteurs d'huile d'olive, compte 16 millions d'oliviers sur une surface d'environ 197000 ha, cette culture étant surtout localisée dans les régions montagneuses de la Kabylie. Les olives à huile représentent 95% de la production totale d'olives, Les variétés rencontrées sont principalement :

- ◆ **La chemlal** : c'est une variété autostérile que l'on retrouve surtout en kabylie et dans la région montagneuse de Blida, où elle représente 50% des oliviers cultivés en Algérie ;
- ◆ **L'azeradg** : elle est surtout localisée en Kabylie, elle représente 5% de l'oliveraie Algérienne ;
- ◆ **La sigoise** : c'est une variété que l'on rencontre particulièrement dans l'ouest du pays, dans la olaine de sigoise, elle représente 20% de l'oliveraie Algérienne.
- ◆ **La bouchouk et la limli** : ceux sont deux variétés cultivées principalement en Kabylie, elles représentent 2% des oliviers cultivés en Algérie.

A coté de ces variétés locales, on rencontre aussi des variétés introduites d'Espagne, de France et d'Italie comme la cornicobra, la luques et la frantoio [4].

Actuellement, la production d'huile d'olive connaît une régression continue jusqu'à l'incapacité de satisfaire la consommation nationale.

Un exemple de la production nationale en huile d'olive pour l'année 94/95 est représenté dans le tableau 2 [5].

Tableau 2 : Production d'huile d'olive par différentes Wilayates d'Algérie pour l'année 94/95 [5].

Wilayates	Prévisions récoltes (quintaux/ha)	Production réalisées (quintaux/ha)
Tlemcen	51638	29891
Sidi Bel Abbes	500	480
Ain Timouchente	3000	2200
Saida	2500	4000
Oran	11500	5800
Mascara	20000	20000
Médéa	16500	12978
Djelfa	0	0
Chlef	9066	5200
Ain Defla	5165	5500
Blida	8005	9500
Tipaza	9600	12451
Alger	0	0
Boumerdess	61120	91700
TiziOuzou	331579	234457
Bouira	125550	164392
Bejaia	681000	559000
Jijel	129705	198881
Mila	22500	15850
Constantine	400	1173
M'sila	1960	1950
Batna	15640	163662
Setif	201100	211155
Bordj Bou Arreridj	23990	60000
Oum El Bouaghi	0	0
Khenchla	760	849
Tebessa	1260	1035
Guelma	34620	41524
Souk Ahras	4300	8370
Annaba	2916	2824
El Tarf	8280	8280
Skikda	76000	75000

I-3/ Technologie de production d'huile d'olive :

La quantité de produit obtenue dépend de la rapidité du traitement, de la durée du stockage et des différentes précautions à prendre en considération pour éviter le développement des micro-organismes par le biais de blessures du fruit [6].

Le système de production d'huile d'olive comprend en général cinq opérations qui sont représentées sur la figure 1 :

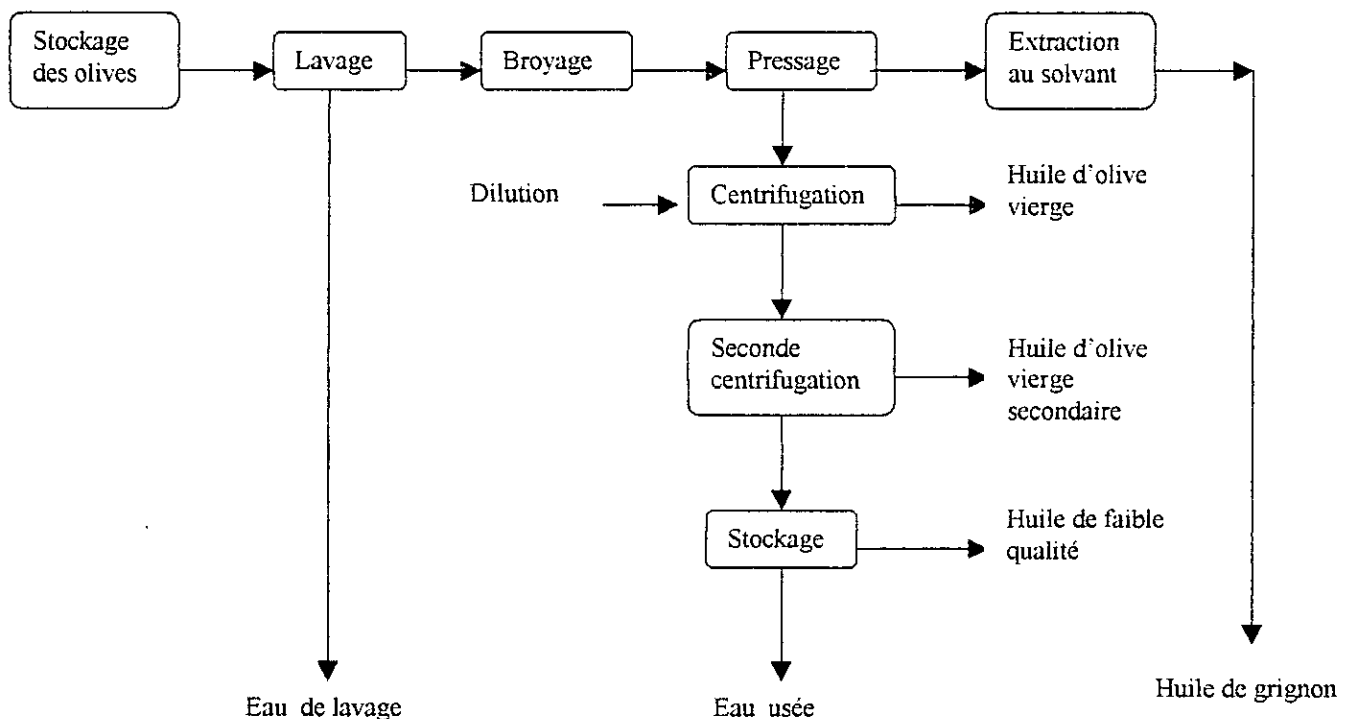


Figure 1 : Processus de production d'huile d'olive [6].

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

I-4/ Composition de l'olive :

L'olive est une drupe, sa composition physique est indiquée sur la figure 2 :

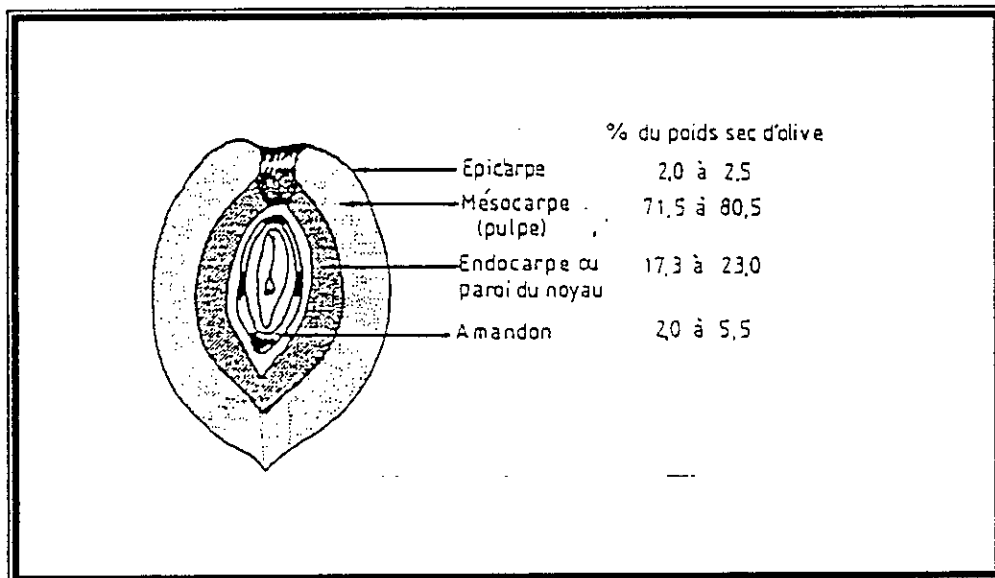


Figure 2 : Composition physique de l'olive en % de la matière sèche [7].

La composition chimique des différents constituants de l'olive est très variée, le tableau 3 présente la composition chimique moyenne de l'olive en fonction des différentes parties anatomiques :

Tableau 3 : Composition chimique moyenne de l'olive en % de la matière sèche [7]

Constituant	Matières grasses	M.A.T*	Cellulose	Cendres totales
Épicarpe ou membrane	3,40	9,80	2,40	1,60
Mésocarpe ou pulpe	51,80	9,60	12,00	2,30
Endocarpe	0,80	1,30	74,10	1,20

*M.A.T : Matières azotées totales.

I-5/ Définition des sous-produits de l'oléiculture :

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

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

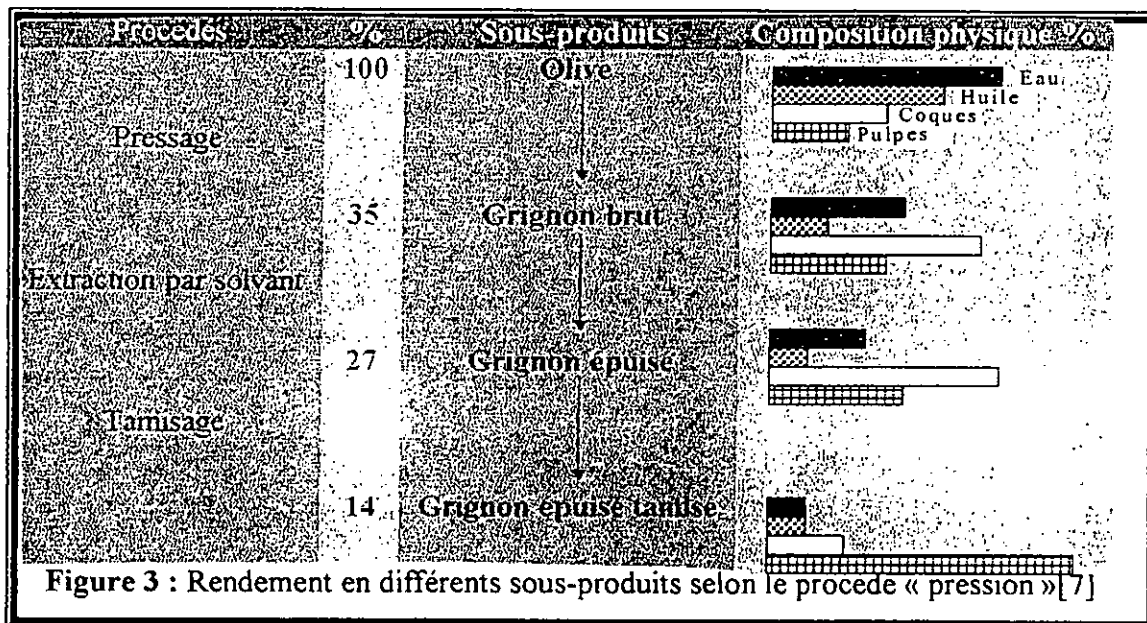
Il existe d'autres procédés comme le procédé Acapulco, qui comprend la séparation préalable du noyau et de la pulpe avant l'extraction de l'huile.

Une certaine confusion dans les publications, ne permet pas toujours d'identifier clairement le type de sous-produit résultant de cette opération (la pression des olives). Nous adopterons la nomenclature et les définitions proposées par NEFZAOUI et col au séminaire international sur la valorisation des sous-produits de l'olivier organisé par la FAO (Madrid, 1983) [8].

1. *Le grignon brut* : c'est un 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 (3%), ce qui favorise son altération rapide lorsqu'il est laissé à l'air libre [7,8].
2. *Le grignon épuisé* : c'est le résidu obtenu après déshuilage ou épuisement du grignon brut par un solvant (généralement l'hexane) [7].
3. *Le grignon tamisé (partiellement dénoyauté)* : il résulte de la séparation partielle des débris de coques et de la pulpe par ventilation. Il est dit gras si son huile n'est pas extraite par un solvant et dégraissé ou épuisé si son huile est extraite par un solvant [3,7].
4. *La pulpe de l'olive* : c'est la pâte obtenue lorsque le noyau a été séparé avant l'extraction de l'huile, elle est riche en eau (60%) et de conservation très difficile [8].
5. *Les margines* : c'est un résidu aqueux séparé de l'huile par centrifugation ou sédimentation, il représente 40% des olives traitées .

Les quantités de ces sous-produits sont fonction des procédés d'extraction de l'huile [9]. En adoptant la valeur moyenne de 35% pour le pourcentage de grignons d'olive bruts par rapport aux olives traitées, on peut estimer la production mondiale de grignons bruts à environ 3 millions de tonnes /an [6].

La figure 3 précise le mode d'obtention des différents types de grignons d'olive :



I-6/ Composition chimique des grignons d'olive :

La composition chimique des grignons d'olive varie dans de larges limites selon le stade de maturité, le procédé d'extraction de l'huile, et l'épuisement.

Il est très difficile de comparer les différentes données bibliographiques relatives à ce sujet, car dès le départ il s'est établi une confusion au niveau de la définition des différents sous-produits (tourteau, pulpe, grignon). De plus, les auteurs négligent souvent de préciser les conditions d'obtention des sous-produits (presse, centrifugation, épuisement aux solvants etc...). Cependant, on peut retenir les données générales représentées sur le tableau 4 :

Tableau.4^m: Composition chimique des sous- produits du grignon d'olive [9,10].

Type de grignon	Brut	Epuisé	Tamisé	Epuisé-tamisé
Matière sèche	69,0 - 90	86,0 - 95,0	89,0 - 95	88,0 - 90,0
Cendres totales	3,0 - 14,5	5,8 - 9,3	10,0 - 25,3	11,0 - 23,0
Matière azotée totale	5,0 - 10,3	12,4 - 16,2	6,8 - 9,0	9,6 - 11,3
Matière grasse	5,3 - 12,5	1,1 - 7,4	6,9 - 15,0	2,0 - 6,5
Cellulose brute	32,0 - 47,5	32,0 - 53,3	12,0 - 33,5	14,0 - 26,3

- ❖ *La matière sèche* : elle varie selon le type de grignon. DEMAY cité par ABDOULI [10], signale que la presse hydraulique et la super presse laissent un grignon à 25% d'humidité contre 60% pour la presse continue. Des variations sensibles sont également observées dans une même usine [10].
- ❖ *Les matières minérales* : des teneurs en cendres de 4 à 5 fois plus importantes que celles considérées comme une moyenne (5% de la matière sèche) sont rapportées par plusieurs auteurs. Cet excès est attribué à une contamination par le sable au niveau des huileries[7]. Le potassium et le calcium apparaissent comme les éléments prédominants, suivis du phosphore et du sodium.
- ❖ *Les matières grasses* : la teneur en matière grasse est souvent élevée et demeure fonction du mode d'extraction de l'huile. La pression laisse des grignons et pulpes riches en matières grasses (30% de matières grasses en moyenne). L'épuisement par un solvant la réduit à 4 - 5% de la matière sèche, ce qui explique l'intérêt de cette opération. La matière grasse du grignon d'olive est riche en acides : caprylique, caproïque, oléique et linoléique ; les proportions en chacun de ces acides gras diffèrent selon l'origine et les traitements appliqués [7].

Le tableau 5 donne la composition en acides gras du grignon d'olive :

Acide gras	Pourcentage (%)
Acide oléique	65,11
Acide linoléique	12,74
Acide palmitique	10,46
Acide linoléique	0,26
Acide laurique	0,14
Acide myristique	0,10
Acide caproïque	0,08
Acide caprilique	0,05
Autres	2,06

Tableau 5 : composition en acides gras des grignons d'olive [7].

- ❖ *Les fibres brutes* : la teneur en cellulose brute est également élevée et varie de 15 à 50% de la matière sèche, elle dépend de la proportion des coques présents dans le résidu. Ces coques renferment 74 % de fibres brutes contre 2,43% et 12,01% contenus respectivement dans la pellicule et la pulpe [10].

Les membranes cellulaires sont riches en lignine (30% de la matière sèche).

- ❖ *Matières azotées totales* : la teneur en matières azotées totales varie selon le type de grignon, mais reste relativement modeste. L'azote protidique représente 95% de l'azote total et sa solubilité est particulièrement faible puisque, une grande partie de l'azote (80 à 90%) est liée à la fraction ligneux-cellulosique. Ainsi contrairement aux autres tourteaux, le grignon d'olive est pauvre en protéines [3,7].
- ❖ *Les composés phénoliques* : les seules données existantes sont relatives aux fruits avant extraction de l'huile. Les polyphénols sont présents dans l'olive à un pourcentage de l'ordre de 0,3 à 5% de la matière sèche, ce sont surtout des orthodiphénols. L'oleuropeine, glucoside amer, est le composé le plus abondant et le plus caractéristique des oléagineux. Sa structure correspond à un glucoside de l'acide élénolique (figure 4) [7].

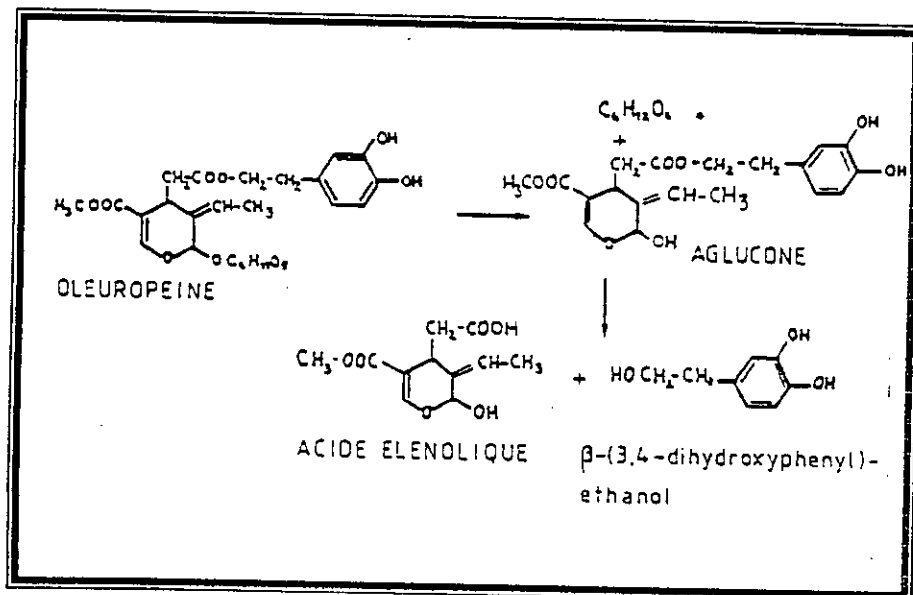


Figure 4 : Structure de l'oleuropeine [7].

I-7/ Estimation quantitative des rejets d'huilerie d'olive :

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

- ◆ 20 kg d'huile ;
- ◆ 40 kg de grignons ;
- ◆ 40 kg de margines contenant 8 à 12% d'huile ainsi que des constituants hydrosolubles de l'olive [6].

I-8/ Valorisation des sous-produits de l'oléiculture :

Les grignons d'olive, 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 industrielles.

- a) *Valorisation des coques* : la forte valeur énergétique des coques issues du décorticage, permet leur utilisation comme combustible, assurant ainsi la couverture énergétique des huileries, voir des savonneries qui y sont souvent jointes. Les cendres peuvent servir d'engrais en raison surtout de leur teneur en oxyde de potassium [2,11] .
- b) *Valorisation des grignons* : les grignons d'olive mélangés à des fourrages sont utilisés comme aliment pour le bétail. Ils sont également utilisés dans la production continue du furfural par hydrolyse acide et d'alcool par saccharification.

Aux USA, les grignons d'olive sont utilisés principalement pour le nettoyage de certaines surfaces métalliques par sablage [2,11].

- b) *Valorisation des eaux de végétation* : les margines ou eaux de végétation sont des résidus liquides à forte charge polluante et à pH acide. Ils contiennent des sous-produits hydrosolubles à potentialité et valeur marchande non négligeables : sucres ; certains fermentescibles en alcool (raffinose, mannose, saccharose, glucose, arabinose,xylose) et alcools dérivés; des polyphénols à effet conservateur par leur pouvoir antioxydant et antibactérien. D'aucuns pensent que le coût des techniques de détermination et de purification pourrait être une étape limitante pour une valorisation économiquement rentable de ces polyphénols [2].

Chapitre II

Les résidus lignocellulosiques (composition et structure)

I/ INTRODUCTION :	14
II-1/ STRUCTURE DE LA PAROI CELLULAIRE DES RESIDUS LIGNOCELLULOSIQUES :	14
II-2/ COMPOSITION DES RESIDUS LIGNOCELLULOSIQUES :	15
II-2-1/ LA CELLULOSE :	15
II-2-2/ LES HEMICELLULOSES :	17
II-2-3/ LES LIGNINES :	18
II-3/ NATURE DE LA RESISTANCE STRUCTURALE DES CONSTITUANTS PARIETAUX :	19
II-3-1/ EFFET DE LA STRUCTURE DE LA CELLULOSE SUR L'HYDROLYSE :	19
II-3-2/ EFFET DE LA LIGNINE SUR L'HYDROLYSE :	19
CONCLUSION :	20

Les résidus lignocellulosiques (composition et structure)

I/ Introduction :

La biomasse lignocellulosique est constituée essentiellement par les parois végétales des plantes récoltées, la nature des constituants de ces parois dépend très nettement de la position taxonomique du matériel envisagé. C'est ainsi que chez les plantes supérieures, on trouve essentiellement des celluloses, des hemicelluloses et des lignines.

Ainsi, aucun de ces constituants n'appartient vraiment en propre à un groupe donné. Par ailleurs, grâce à un certain nombre de réactions plus ou moins spécifiques et de nature cytochimique, la mise en évidence des composés les plus fréquemment rencontrés dans les parois est désormais possible.

II-1/ Structure de la paroi cellulaire des résidus lignocellulosiques :

D'un point de vue pondéral, la biomasse lignocellulosique est constituée principalement des parois végétales des plantes récoltées. L'anatomie des parois végétales est bien connue, la figure 5 en donne une représentation schématique :

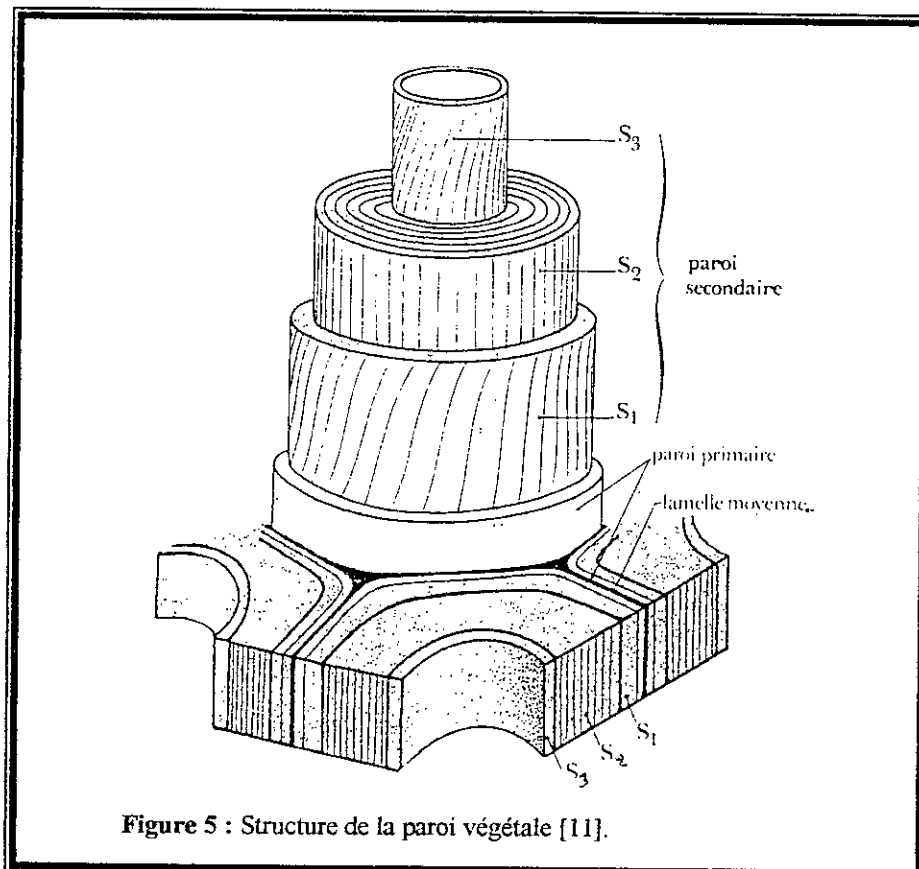


Figure 5 : Structure de la paroi végétale [11].

On y observe que cette paroi est constituée de différentes couches successives dont les propriétés physico-chimiques et mécaniques s'intègrent pour donner à la paroi sa spécificité fonctionnelle.

II-2/ Composition des résidus lignocellulosiques :

Chimiquement, les parois végétales comprennent trois constituants principaux : la cellulose, l'hémicellulose, et la lignine.

II-2-1/ La cellulose :

Elle constitue le polysaccharide de structure de la paroi cellulaire le plus abondant du règne végétal. C'est un biopolymère de nature fibrillaire, synthétisé dans les cytoplasmes des cellules végétales et est déposé à l'extérieur de la membrane plasmidique, participant ainsi au maintien de la rigidité du tissu [12,13].

Le poids moléculaire minimal de la cellulose de différentes sources varie entre 50 000 et 250 000 Da selon les espèces, ce qui vaut à 300 jusqu'à 1500 unités de glucose. Bien que la cellulose ait une affinité pour l'eau, elle y est complètement insoluble [14].

A la suite des premiers travaux (1937 et 1955), on estime qu'une bonne partie de la cellulose des parois squelettiques existe sous forme de cristaux juxtaposés. L'élément de base de chaque cristal serait une molécule de cellobiose (figure 6 et 7), où les oxygènes liés respectivement aux carbones 4 et 1' correspondraient au sommet du cristal [13,14].

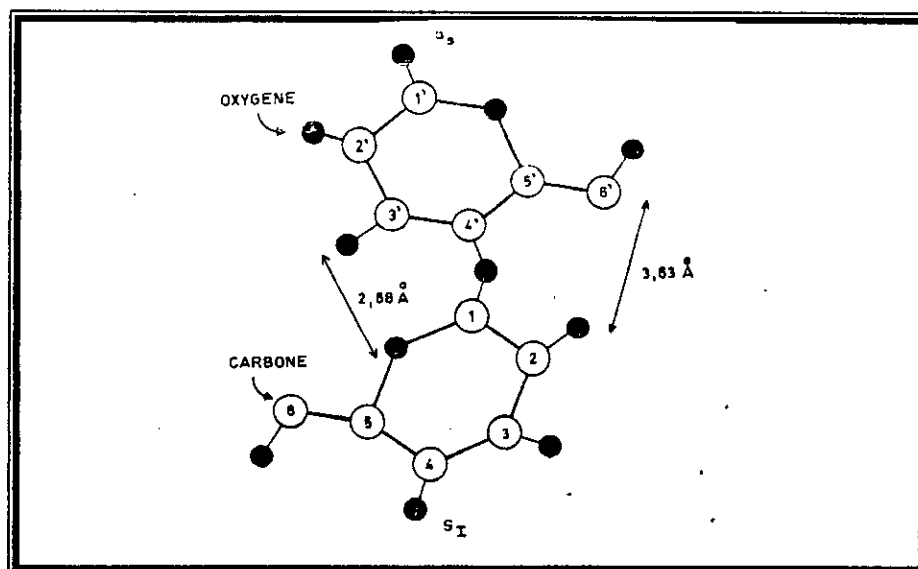


Figure 6 : Arrangement spatial d'une molécule de cellobiose intégrée dans un cristal de cellulose [13].

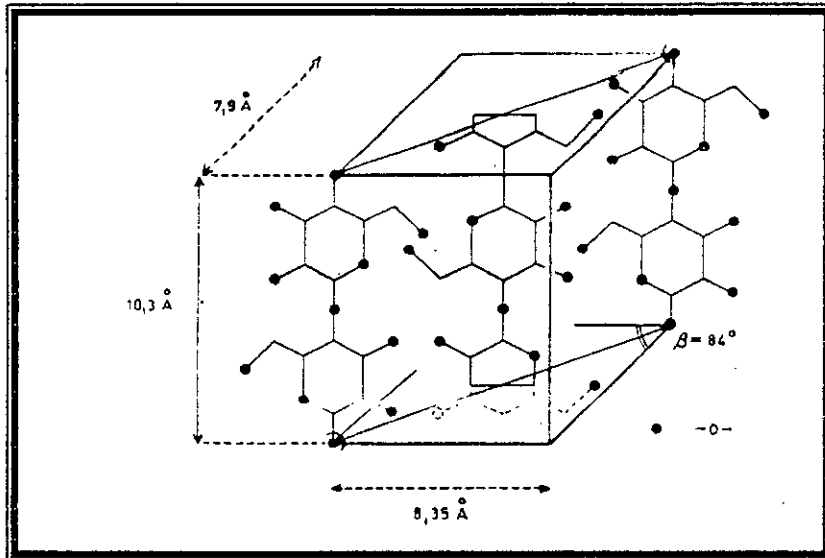


Figure 7 : Un cristal unitaire de la cellulose [13].

Pour rendre compte de certaines propriétés de la cellulose en rapport avec les polysaccharides de constitution des parois cellulaires, plusieurs auteurs imaginent que les microfibrilles de la cellulose sont caractérisées par deux zones distinctes : une zone cristalline au niveau de laquelle les microfibrilles sont parfaitement arrangées, et une zone amorphe où les microfibrilles ne sont plus nécessairement parallèles et où une certaine désorganisation peut être révélée.

Une coupe d'une microfibrille (figure 8) révèle une zone centrale de nature cristalline entourée d'une sorte d'enveloppe paracristalline et contenant entre autres les polysaccharides non cellulosiques [13].

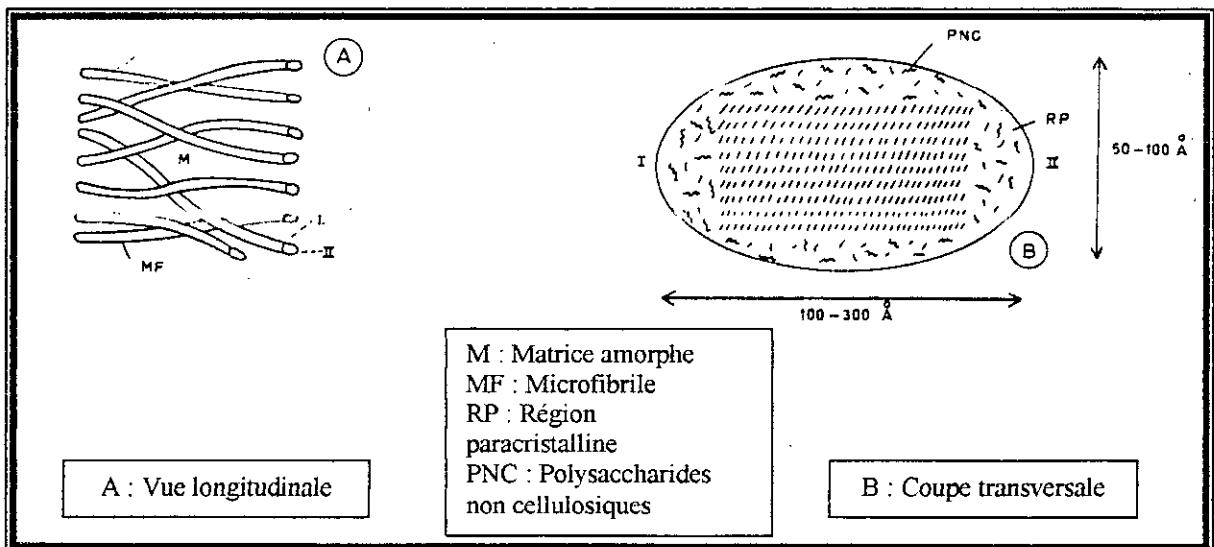


Figure 8 : Structure des microfibrilles de la cellulose [13].

Cependant, l'examen aux rayons X et un certain nombre d'observations ont amené les chercheurs à imaginer que la cellulose serait constituée de chaînes hélicoïdales dont l'axe correspondrait à celui de la fibrille élémentaire (figure 9). Les molécules de cellobiose formeraient la largeur de cette sorte de ruban enroulé et seraient disposées parallèlement à l'axe de la fibrille [13].

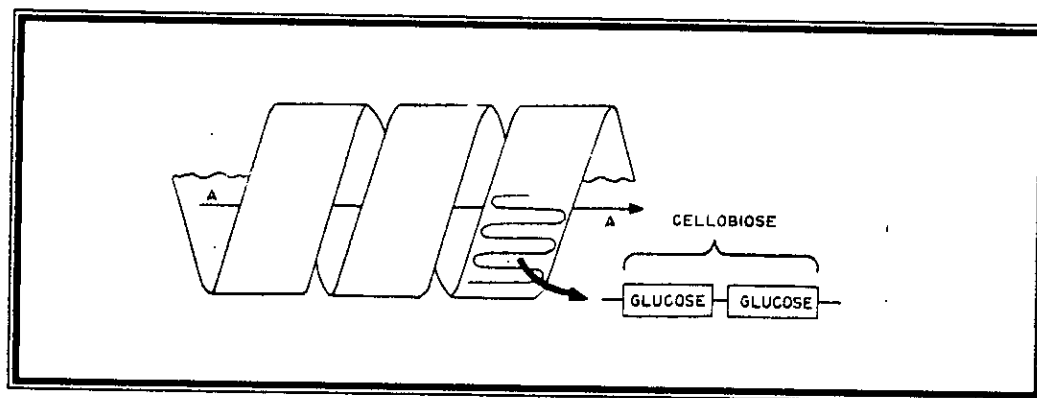


Figure 9 : Structure hélicoïdale d'une microfibrille de cellulose [13].
A : grand axe de la fibrille.

La cellulose serait donc le résultat de la polymérisation de glucopyranoses. Par hydrolyse acide de la fraction cellulosique, on obtient près de 90% (du poids sec) de glucose. Cependant, d'autres sucres sont encore révélés (galactose, mannose, arabinose, xylose) qui indiquent que la cellulose n'est qu'un simple polymère de β -glucopyranose, de poids moléculaire élevé (1 à $2 \cdot 10^6$) et de degrés de polymérisation variant de 2000 à 10000 [15,16,17].

II-2-2/ Les hémicelluloses :

Il s'agit d'une classe d'hétéropolysaccharides, pouvant exister sous forme amorphe ou paracristalline, associés à la cellulose par des liaisons hydrogène, et qui, contrairement à la cellulose sont solubles dans les bases diluées (la soude, la potasse) [12].

Les principaux constituants des hémicelluloses sont essentiellement des sucres en C_5 (xylose et arabinose); le glucose est toujours présent.

L'hydrolyse des hémicelluloses fournira donc des pentoses, non ou peu fermentescibles en ethanol, mais fermentescibles par la fermentation acetonobutylique [12,17].

Le tableau 5 donne la composition en sucres neutres des hémicelluloses de différents végétaux :

Végétal	Xylose (%)	Arabinose (%)	glucose (%)	Divers (%)
Tiges de maïs	70,5	9,0	14,5	5,9
Paille de blé	57,9	9,1	28,1	5,0
Bagasse	59,5	14,5	26,0	-

Tableau 5 : Composition en sucres neutres des hemicelluloses de différents végétaux [11].

II-2-3/ Les lignines :

Il s'agit des constituants les plus importants, et probablement les mieux connus des parois secondaires. Ils imprègnent pratiquement tous les feuillettes de la paroi.

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

Les produits de dégradation des lignines ne sont pratiquement pas fermentescibles[15,18].

D'après des analyses plus poussées, la lignine existerait sous forme de microgel (figure 10), fixant des ions négatifs et environné de charges positives [13].

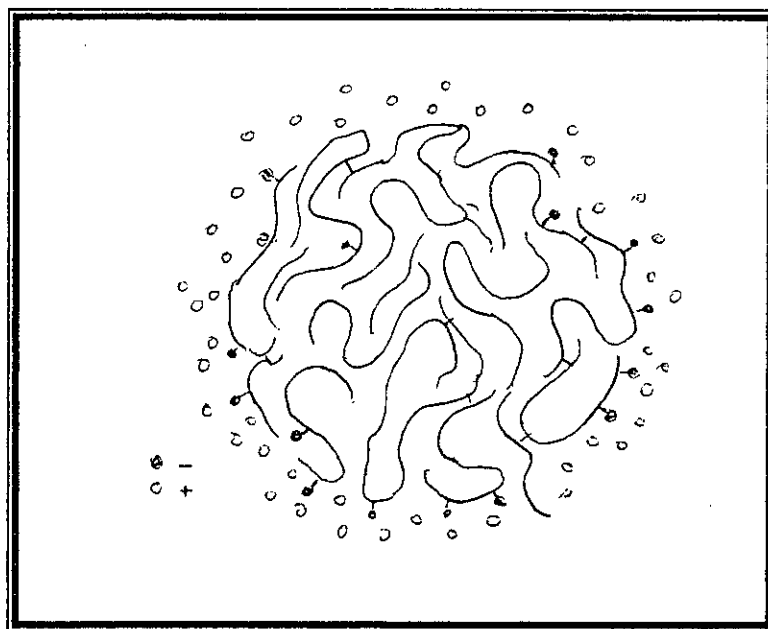


Figure 10 : Schémas représentant un microgel de lignine [13].

II-3/ Nature de la résistance structurale des constituants pariétaux :

II-3-1/ Effet de la structure de la cellulose sur l'hydrolyse :

La cellulose étant insoluble dans l'eau et de structure complexe, sa susceptibilité à l'attaque enzymatique dépend significativement de ses caractéristiques structurales qui sont : la surface spécifique et la cristallinité.

Plusieurs auteurs [19,20,21], ont mentionné que l'adsorption des molécules de l'enzyme sur la surface de la cellulose, est une phase très importante pour le déroulement du processus d'hydrolyse. L'enzyme cellulolytique commence par dégrader la cellulose amorphe (plus accessible); puis la cellulose cristalline (moins accessible), plus la cristallinité augmente et plus la cellulose devient plus résistante à la dégradation enzymatique.

D'autres auteurs[22,23,24], ont indiqué que les caractéristiques structurales influent profondément sur les cinétiques d'hydrolyse. En effet, ces deux paramètres (la surface spécifique et la cristallinité) interviennent dans la détermination des vitesses initiales du processus enzymatique.

II-3-2/ Effet de la lignine sur l'hydrolyse :

La combinaison partielle de la lignine à la cellulose cristalline existant dans la biomasse lignocellulosique acquiert une résistance biologique très élevée. Les micro-organismes capables de dégrader la cellulose perdent cette capacité par la présence de la lignine. La relation entre le degré de delignification et la vitesse d'hydrolyse est représentée sur la figure 11:

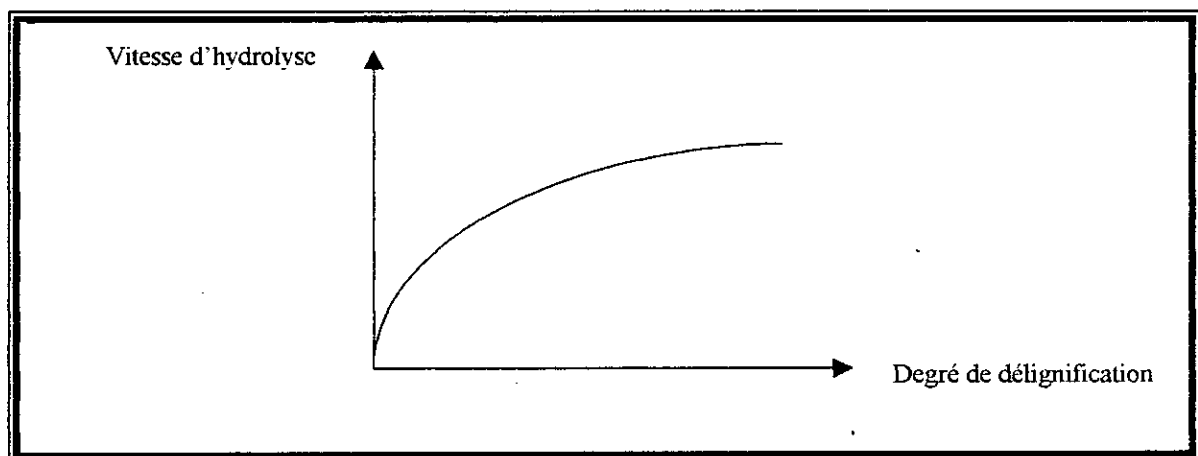


Figure 11 : Effet du degré de délignification sur la vitesse d'hydrolyse [22].

FAN et col [25], ont observé que la vitesse d'hydrolyse de la paille de blé augmente considérablement avec l'augmentation du degré de délignification jusqu'à ce que celui ci atteigne 50% ; au delà de cette valeur, la vitesse augmente peu.

Conclusion :

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

Du fait de son état cristallin et de sa protection par la matrice lignine-hemicellulose, la cellulose native des tissus végétaux n'est que faiblement dégradable par les enzymes cellulolytiques. Pour obtenir une hydrolyse la plus complète possible, un prétraitement du résidu lignocellulosique serait nécessaire ; ce dernier aura pour objet de détruire toute, ou une partie, de la matrice lignine-hemicellulose et d'augmenter la surface du substrat accessible aux enzymes.

Chapitre III

Les Prétraitements

III-1/ LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE PRÉTRAITEMENT :	22
III-1-1/ LES PRÉTRAITEMENTS PHYSIQUES :	22
<i>III-1-1-1/ Le broyage :</i>	23
<i>III-1-1-2/ La pyrolyse :</i>	23
<i>III-1-1-3/ Irradiation à haute énergie :</i>	23
<i>III-1-1-4/ Prétraitement à la vapeur :</i>	24
III-1-2/ LES PRÉTRAITEMENTS CHIMIQUES :	24
<i>III-1-2-1/ Les prétraitements alcalins :</i>	24
<i>III-1-2-2/ Les prétraitements acides :</i>	25
<i>III-1-2-3/ Solvants de la cellulose :</i>	25
III-1-3/ LES PRÉTRAITEMENTS BIOLOGIQUES:	25

Les Prétraitements

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

Dès lors, dans les procédés de valorisation, la biomasse lignocellulosique subit d'abord des prétraitements, destinés à améliorer son aptitude à l'hydrolyse enzymatique.

Le but de ces prétraitements est d'ouvrir la structure du matériel lignocellulosique qui se traduit par :

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

III-1/ Les différentes méthodes de prétraitement :

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

Le **tableau 6** donne les différentes méthodes utilisées. Ces prétraitements sont classés selon leur mode d'action sur le substrat en trois grandes catégories : physiques, chimiques, et biologiques. Parmi ces prétraitements, il existe des combinaisons de deux techniques ou plus, appliquées en parallèle ou en séquence.

III-1-1/ les prétraitements physiques :

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

Parmi les prétraitements physiques, on distingue :

Physique	Chimique	Biologique
Broyage à boules	<u>Alcalis</u>	Champignons
Broyage à marteau	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hydroxyde de sodium ▪ Ammoniaque ▪ Sulfite d'ammonium 	
	<u>Acide</u>	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Acide sulfurique ▪ Acide chlorhydrique ▪ Acide phosphorique 	
Pyrolyse	<u>Gaz</u>	
Irradiation à haute énergie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dioxyde de chlore ▪ Dioxyde d'azote ▪ Dioxyde de soufre 	
	<u>Agent oxydant</u>	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Peroxyde d'hydrogène ▪ Ozone 	
Vapeur	<u>Solvants de la cellulose</u>	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cadoxen ▪ CMCS 	
	<u>Solvants extractifs de la lignine</u>	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Extraction ethanol-eau ▪ Extraction benzene-ethanol ▪ Extraction éthylène-glycol ▪ Extraction butanol-eau 	

Tableau 6 : Les méthodes de prétraitement utilisées [25].

III-1-1-1/ Le broyage :

C'est une méthode efficace. En effet, les forces de cisaillement et de compression permettent la réduction de la cristallinité, la diminution du degré de polymérisation et la diminution de la taille des particules. On distingue le broyage à boules et le broyage à marteaux [25].

III-1-1-2/ La pyrolyse :

Il a été récemment découvert que la pyrolyse est un processus qui augmente la susceptibilité du matériel lignocellulosique à l'hydrolyse. Au dessus de 300°C, la cellulose se décompose rapidement pour donner des composés gazeux et d'autres bitumeux. Par contre à des températures intermédiaires, la décomposition a lieu lentement et peu de produits volatils sont formés [25].

III-1-1-3/ Irradiation à haute énergie :

L'irradiation de la cellulose pure aboutit à une dégradation oxydative des molécules, une déshydrogénation et une destruction des unités anhydroglucoses avec libération du dioxyde de carbone. Ce prétraitement affecte la lignine et conduit à une dépolymérisation intense de la cellulose [25].

III-1-1-4/ Prétraitement à la vapeur :

Cette technique est basée sur le traitement sous pression et à chaud (225°C, 25 atm) du substrat par un liquide volatil. L'arrêt du prétraitement s'effectue par une décompression explosive pour évaporer le liquide et réduire la température. Trois phénomènes peuvent être mis en évidence au cours de ce prétraitement [12, 26] :

- ◆ Une autohydrolyse due à la libération des groupements acétyles substitués sur de nombreux sucres des hémicelluloses et opérant in situ une hydrolyse partielle de ces polymères ;
- ◆ Une fusion des lignines, suivie d'une recondensation en gouttelettes au refroidissement ;
- ◆ Une destruction intense due à la libération explosive du produit, se traduit par une augmentation très importante des surfaces accessibles.

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

La cellulose obtenue suivant ce procédé est presque totalement hydrolysable ; la lignine devient extractible par les solvants, tandis que les hémicelluloses sont converties en oligosides solubles. Cette technique semble être actuellement la seule qui permet de récupérer la totalité des sucres présents dans le végétal [11].

III-1-2/ Les prétraitements chimiques :

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

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

III-1-2-1/ Les prétraitements alcalins :

Les principaux produits utilisés dans ce type de prétraitement sont : la soude caustique, le carbonate de sodium, et l'ammoniaque.

Le prétraitement à la soude diluée permet l'augmentation de la surface spécifique, la diminution de la cristallinité, l'ouverture des liaisons lignine-carbohydrates et la destruction de la structure de la lignine. Le résidu liquide obtenu est analogue aux liqueurs noires des papeteries, et pose des problèmes sévères d'élimination ou de récupération des réactifs. Le résidu solide doit être lavé et neutralisé [11].

Les résidus lignocellulosiques répondent différemment au traitement. En effet, FAN et *col* [25], ont observé que la digestibilité du bois tendre (quantité en lignine élevée), augmente lentement au cours du traitement à la soude, alors que celle du bois dur (quantité en lignine faible) augmente considérablement au cours du même traitement.

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

III-1-2-2/ Les prétraitements acides :

L'utilisation du prétraitement acide avant l'hydrolyse enzymatique n'a été étudiée que récemment. Les acides utilisés sont : l'acide sulfurique, l'acide phosphorique, et l'acide chloridrique. Le plus souvent utilisé étant l'acide sulfurique à des concentrations de 1 à 3% ; les durées de traitement varient suivant les technologies utilisées [11].

A l'issue du traitement, l'effluent liquide renferme des sucres (essentiellement des sucres en C₅), provenant de l'hydrolyse des hémicelluloses, le résidu solide renferme la partie cellulosique et la lignine [11].

III-1-2-3/ Solvants de la cellulose :

Les solvants tels que : l'oxyde de triéthylène, thiocyanate de strontium, améliorent sensiblement la dégradabilité de la cellulose ; le plus efficace est le cadoxen (solution alcaline d'éthylène diamine) qui permet d'atteindre des rendements d'hydrolyse proches de 90% au lieu de 20% pour le même substrat non traité. Quant à la lignine, une mixture alcalin – ethanol – eau, semble être un solvant sélectif pour le traitement de délignification [25, 27].

III-1-3/ Les prétraitements biologiques :

Ce type de prétraitement utilise des micro-organismes ayant la capacité de sécréter des enzymes capables de dégrader la cellulose, les hémicelluloses et la lignine ; ce sont généralement des champignons de pourriture blanche, brune et rouge [25, 28].

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

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

Chapitre IV

Hydrolyse enzymatique des résidus lignocellulosiques

IV-1/ LES ENZYMES CELLULOLYTIQUES :	27
IV-1-1/ L'ENDO-GLUCANASE (1-4- β -D-GLUCANE GLUCOHYDROLASE : E.C.3.2.14) :	28
IV-1-2/ L'EXO-GLUCANASE (1-4- β -D-GLUCANE CELLOBIOHYDROLASE : E.C.3.2.1.91) :	28
IV-1-3/ CELLOBIASE (β -D GLUCOSIDE-GLUCOHYDROLASE E.C 3.2.21) :	28
IV-2 / LA RÉGULATION ENZYMATIQUE :	29
IV-3 / CONCEPTION ACTUELLE DE L'ACTION DE LA CELLULASE :	29
IV-4/ CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES RÉSIDUS LIGNOCELLULOSIQUES :	31
IV-5 /BILAN DE MATIÈRE DANS LES RÉACTEURS ENZYMATIQUES :	34
IV-5-1/ CAS DES BIOREACTEURS DISCONTINUS:.....	
IV-5-2/ CAS DES BIOREACTEURS CONTINUS :.....	
IV-5-2-a/ Réacteur continu parfaitement agité :.....	36
IV-5-2-b/ Réacteur continu couplé à un ultrafiltre :.....	37

Hydrolyse enzymatique des résidus lignocellulosiques

L'étude des réactions biochimiques se confond pratiquement avec celle des biocatalyseurs ou enzymes. La nature, la quantité, et la distribution dans la cellule, déterminent dans une grande mesure ses voies métaboliques .

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

IV-1/ Les enzymes cellulolytiques :

Dans le cas de la biomasse lignocellulosique, POURQUIE.J et VANDECASTELLE.J [11], citent deux systèmes enzymatiques, l'un spécifique aux hémicelluloses et l'autre spécifique à la cellulose.

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

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

Le champignon *Trichoderma Reesei* est la meilleure source des cellulases extracellulaires connues jusque là, capables d'hydrolyser la cellulose en produits d'un moindre degrés de polymérisation [12, 29].

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

Ce champignon est cultivé dans un milieu où le lactose représente la principale source de carbone. La présence des agents tensio-actifs dans le milieu, facilite la synthèse des cellulases [30].

Les surnageants de culture de tels champignons, contiennent des endo-glucanases, des exo-glucanases et des β -glucosidases [30].

Les préparations obtenues avec le *Trichoderma Reesei* sont beaucoup plus riches en activité β 1-4 cellobiohydrolase que l'on dose sur cellulose cristalline (cellulose microcristalline, papier filtre ou fibre de coton) [31].

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

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

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

Ce sont des glycoprotéines dont la partie glucidique peut atteindre 20% de la masse de l'enzyme, leur point isoélectrique est acide, leur pH optimal est compris entre 4 et 7, et leur poids moléculaire est voisin de 30.000 à 40.000 daltons, mais dans certains cas il est voisin de 13.000 daltons [12, 32].

Les endo-glucanases, opèrent d'une façon aléatoire en réalisant des coupures à l'intérieur de la chaîne de la cellulose et créent de nouveaux sites d'attaque pour les exo-glucanases [32].

IV-1-2/ L'exo-glucanase (1-4- β -D-glucane cellobiohydrolase : E.C.3.2.1.91) :

Les exo-glucanases attaquent la molécule de la cellulose en bout de chaîne, du côté non réducteur, en libérant des résidus cellobioses, elles sont alors appelées cellobiohydrolases (CBH= β -1-4 glucane 4 cellobiohydrolase), ou bien en libérant du glucose, elles sont alors appelées glucohydrolases (GH= β -1-4 glucane 4 glucohydrolase). Elles sont également capables d'attaquer les cellodextrines, la cellulose microcristalline, et les fibres du coton [12, 32].

IV-1-3/ Cellobiase (β -D glucoside-glucohydrolase E.C 3.2.21) :

Les cellobiases libèrent du glucose à partir des oligomères libérés par l'action d'endo et ou / d'exo-glucanases. Leur affinité pour leur substrat augmente lorsque le degré de polymérisation décroît, et présente un maximum pour le cellobiose d'où le nom de Cellobiase fréquemment utilisé [32, 33].

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

IV-2 / La régulation enzymatique :

L'activité du complexe cellulolytique est soumise à une régulation précise à travers les inhibitions subies par chacun des constituants. En effet, ces enzymes sont compétitivement inhibées à chaque stade du processus d'hydrolyse par l'accumulation des produits d'hydrolyse, ce qui retarde progressivement la saccharification [12].

Les exo-glucanases sont inhibées par le cellubionolactone et le gluconolactone. Le glucose est aussi inhibiteur, mais c'est le cellobiose, inhibiteur compétitif qui influe le plus sur cette activité. Quant aux cellobiases, elles sont très fortement inhibées par le gluconolactone, le glucose provoque aussi une inhibition compétitive mais plus faible [12, 24].

De nombreuses endo-glucanases sont notablement affectées par le cellobiose. Celui-ci est aussi le principal inhibiteur de l'action coopérative des endo et exo-glucanases [24].

Les principaux régulateurs sont donc le glucose et le gluconolactone pour les β -glucosidases, et le cellobiose pour les endo et exo-glucanases.

Ces inhibitions dues aux produits des réactions catalysées, montrent tout l'intérêt qui réside dans l'isolement de souches, dont les enzymes ne sont pas soumises aux retro-inhibitions pour augmenter le taux de dégradation de la cellulose [12].

IV-3 / Conception actuelle de l'action de la cellulase :

De nombreux chercheurs ont étudié la dégradation enzymatique de la cellulose, mais malgré leurs efforts, ce mécanisme est encore imparfaitement connu.

La figure 12, schématise la conception actuelle du mode d'action des différentes activités enzymatiques sur la cellulose [34] :

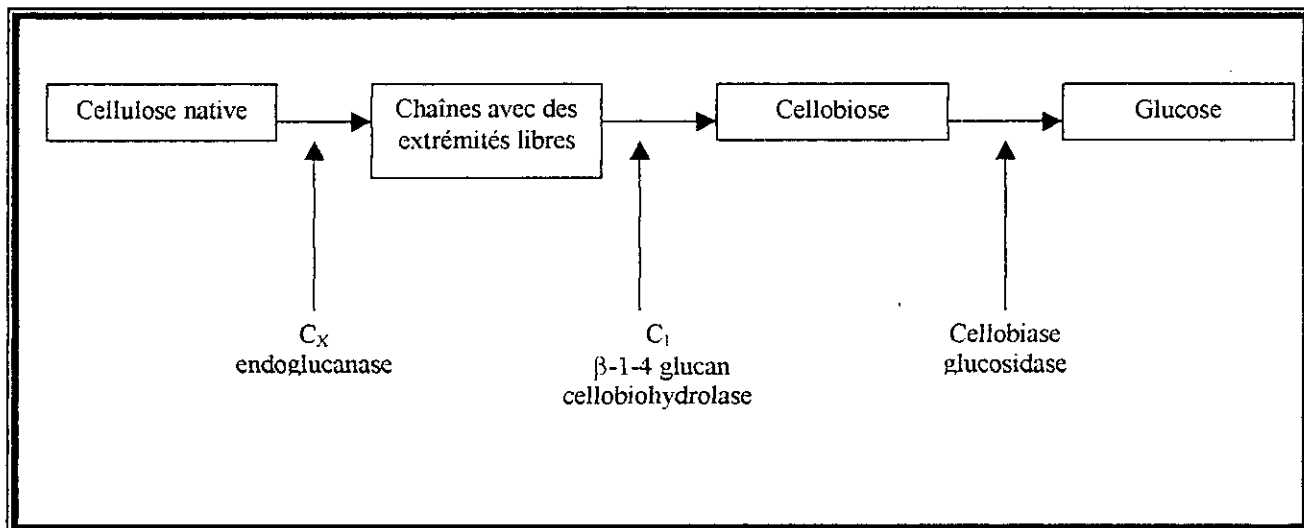


Figure 12 : Conception actuelle de l'activité cellulolytique [34].

Le mode d'action est décrit par J.POURQUIE et cité dans [36] :

- Les exo-glucanases attaquent la molécule de la cellulose en bout de chaîne, du côté non réducteur en libérant les résidus cellobioses.
- Les endo-glucanases opèrent de façon aléatoire en réalisant des coupures à l'intérieur des chaînes de cellulose et créent donc des sites d'attaque supplémentaires pour les exo-glucanases.
- Les cellobiases hydrolysent le cellobiose, mais également le cellotriose et le cellotétrone, en glucose.

Le mode d'action de la cellulase peut également varier en fonction de la source de l'enzyme. Néanmoins, ce sont les cellulases bactériennes et fongiques qui ont été les plus étudiées, notamment en raison de leurs utilisations potentielles en biotechnologie.

Le tableau 7 présente les différents micro-organismes sources importantes des cellulases :

Tableau 7 : les différents micro-organismes sources importantes des cellulases [24]

Fungi	Bactérie
Tricoderma viride	Micromonospora ruminantium
Tricoderma koningii	Ruminococcus albus
Tricoderma reesei	Ruminococcus flave facieus
Chaetonium indicum	Bacteriodes ruminantium
Chaetonium cellulotium	Clostridium cellobiomorus
Murothecium verrucaria	Clostridium thermocellulatum
Aspergillus niger	Bacillus subtilis
Rhizopus stolonifer	Arthrobacter luteus
Sporotricum thermophile	Micro polyspora
Sporotricum pulvericentum	Clostridium thermocellum
Penicillium rubrum	Cellulomonas U.D.A.
Penicillium janthinellum	Cellvibrio fulvus
Polyponus versicolor	Cellabrio gibvus
Basidiomycetes opecies	Sporocytophaga mycoccoides
Helmintos poinum cylops	Actinomyces sp.
Fusarium solani	Proactinomyces sp.
Fusarium oxysporum	Nocardia sp.
Stachybotys atra	
Talaromyces emersonu	
Schizophylum commune	
Thermonospora curvata	

IV-4/ Cinétique de l'hydrolyse enzymatique des résidus lignocellulosiques :

La cellulose est un substrat complexe et insoluble, les caractéristiques cinétiques de son hydrolyse enzymatique diffèrent de celles d'un substrat soluble. En effet, elles sont fortement influencées par les facteurs suivants[22] :

- 1) Nature du système enzymatique employé, son mode d'action et l'effet des produits d'inhibition sur son activité enzymatique ;
- 2) Structure et morphologie de la cellulose ;
- 3) Mode d'interaction entre l'enzyme et la cellulose.

La majorité des études antérieures sur l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, ont négligé le fait que les caractéristiques cinétiques correspondant à cette hydrolyse résultent de la nature hétérogène de ce substrat. Par ailleurs, le modèle de Michaelis-Menten, qui est communément utilisé pour les substrats solubles, a été souvent adopté pour représenter ces cinétiques, alors qu'il est connu que ce modèle ne s'applique que dans le cas où [22] :

- Le système réactionnel est homogène ;
- L'accessibilité du substrat ne change pas ;
- Existence d'un état quasi-stationnaire ;
- L'équilibre entre l'enzyme et le substrat est atteint instantanément.

Il est évident que ces hypothèses ne peuvent être valables dans le cas d'un substrat insoluble.

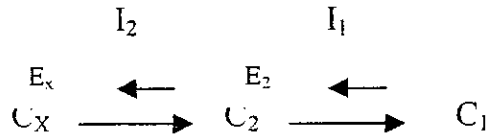
Les propriétés et le mode d'action du système enzymatique cellulolytique (action synergique des trois enzymes), déterminent les cinétiques d'hydrolyse de la cellulose [35].

Jusqu'à présent, aucun modèle cinétique décrivant ce phénomène de catalyse hétérogène n'est satisfaisant, et ce pour les raisons principales suivantes [35] :

- Le substrat est mal défini, tant dans son état initial (surface spécifique, cristallinité, et degrés 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 éclairci, ce qui interdit de définir des séquences de réactions faisant apparaître des entités moléculaires complètement définies.

Dans ce qui va suivre, nous rapporterons quelques modèles cinétiques cités dans la littérature définissant ce phénomène.

Humphrey A.F et *col*, cités dans [35], représentent le modèle cinétique de la disparition de la cellulose comme suit:



C_X : Concentration en substrat solide de la cellulose ;
 C_2 et C_1 : Concentration en cellobiose et glucose respectivement .

Et

$$dC_X/dt = -KE_{ads}C_X I_2 / (I_2 + C_2)$$

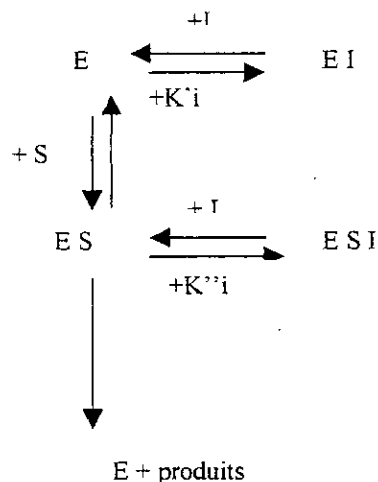
Où K : Constante de vitesse de la réaction ;
 E_{ads} : Grammes d'enzyme / grammes de cellulose ;
 I_2 : Concentration de cellobiose inhibitrice (g/l) ;
 I_1 : Concentration de glucose inhibitrice (g/l) .

Beltrame P.L et *col* [37], ont proposé un autre modèle, qui traduit l'action des enzymes E_1 et E_2 , représentées par l'endo et l'exo-glucanase, en se basant sur l'équation générale décrivant un processus enzymatique inhibé par un produit I, l'équation de vitesse est la suivante :

$$v = \frac{v_{MAX} \cdot C_X}{K_M (1 + C_I/K'_I) + C_S (1 + C_I/K''_I)}$$

Avec C_S : Concentration du substrat ;
 C_I : Concentration de l'inhibiteur ;
 K'_I et K''_I : Constantes d'inhibition.

Le schéma réactionnel est le suivant :



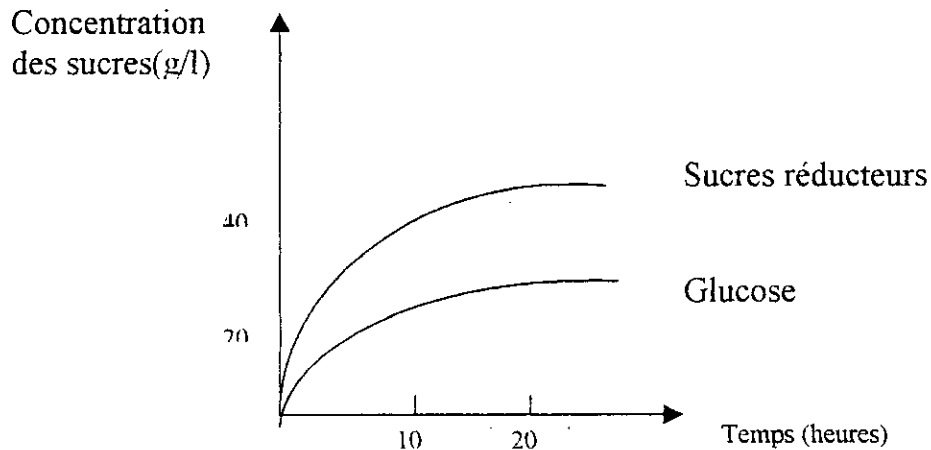


Figure 13 : Cinétique de production des sucres par l'action de la cellulase sur des tiges de maïs. pH=4,8, T=50°C, 60g/l de substrat, 10U d'enzyme/g substrat [35].

IV-5 /Bilan de matière dans les réacteurs enzymatiques :

Le calcul des bioréacteurs enzymatiques s'effectue par la méthode des bilans. Cette méthode consiste à écrire, pour une substance ou un élément donné, la loi de conservation de la matière à un instant donné en un point donné; celle-ci est définie par [39] :

- Un flux d'alimentation ;
- Un flux de sortie ;
- Un flux de disparition ;
- Un flux de création ;
- Un flux d'accumulation.

Le bilan de matière s'écrit donc :

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

En régime permanent, le flux d'accumulation est nul.

IV-5-1/ Cas des bioréacteurs discontinus :

Soit un réacteur enzymatique discontinu de volume V (figure 14.a)

- Le flux d'alimentation est nul ;
- Le flux de disparition de substrat est exprimé par $v V dt$;
- Le flux d'accumulation est exprimé par VdS ;
- Le flux de création est nul.

Où v : Vitesse de disparition du substrat ;
 S : Concentration du substrat ;

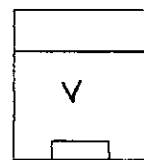


Figure 14 a- principe

t : Temps ;
dS et dt : Variation en S et t.

L'équation du bilan devient :

$$v.V.dt + V.dS = 0$$

$$v = - dS / dt \quad (1)$$

Suivant l'expression de la vitesse, l'équation du bilan de matière est exprimé en fonction des constantes cinétiques et du taux de conversion x .

Le taux de conversion du substrat (x) est défini comme étant la fraction de substrat transformée par rapport à la concentration initiale :

$$X = (S_0 - S) / S_0 \quad (2)$$

Dans le cas d'une cinétique Michaelienne :

$$v = v_{Max} S / (S + Km)$$

L'équation (1) devient :

$$dS / dt = - v_{Max} S / (S + Km)$$

$$v_{Max} dt / Km = - dS / Km - dS / S$$

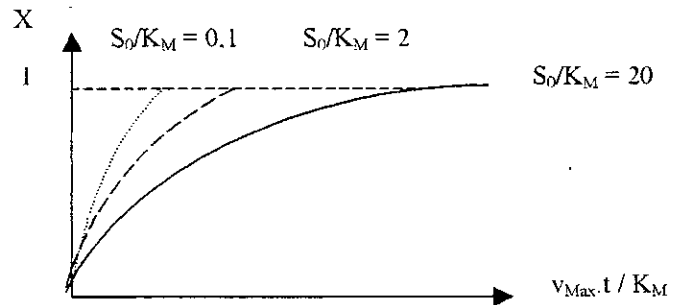
Après intégration entre S et S₀, l'équation du bilan devient :

$$v_{Max} t / Km = x.S_0 / Km + Ln[1/(1-x)] \quad (3)$$

Cette expression n'est valable que pour une enzyme déjà connue et de grande stabilité, car ceci suppose que :

- L'activité de l'enzyme (v_{max}) soit constante durant tout le déroulement de la réaction ;
- Absence d'inhibition par le substrat et le produit ;
- L'irréversibilité de la réaction.

La représentation du taux de conversion x en fonction du nombre adimensionnel $t^* = v_{\max} \cdot t / K_M$ pour différentes valeurs de S_0/K_M permet le choix de la valeur S_0/K_M qui assure un bon rendement ($x \approx 1$) en un minimum de temps (figure 14.b).



b : Bilan de matière

Figure 14 : Cas d'un réacteur discontinu

IV-5-2/ Cas des bioréacteurs continus :

IV-5-2-a/ Réacteur continu parfaitement agité :

Dans ce type de réacteur, les débits d'entrée et de sortie sont égaux à F , le volume réactionnel est donc maintenu constant et égal à V (figure 15).

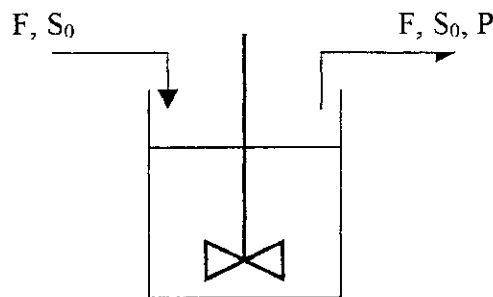


Figure 15 : Principe d'un réacteur continu

- Flux d'entrée = $F S_0 dt$
- Flux de sortie = $F S dt$
- Flux de disparition du substrat = $v V dt$
- Flux d'accumulation = $V dS$
- Le flux de création est nul.

Le bilan s'écrit donc :

$$F.S_0.dt = F.S.dt + v.V.dt + V.dS \quad (4)$$

En régime permanent, le flux d'accumulation est nul :

$$F.S_0.dt = F.S.dt + v.V.dt$$

$$v = F (S_0 - S) / V$$

$$v = (S_0 - S) / \theta \quad \text{avec } \theta = V/F \quad (5)$$

Où θ est le temps de séjour moyen, c'est le temps que met une particule de substrat de l'entrée à la sortie [40].

IV-5-2-b/ Réacteur continu couplé à un ultrafiltre :

Le principe de ce réacteur est le même que celui d'un réacteur continu parfaitement agité simple (RPA), sauf que la fraction soutirée est acheminée vers un dispositif de séparation (UF) (figure 16.a) :

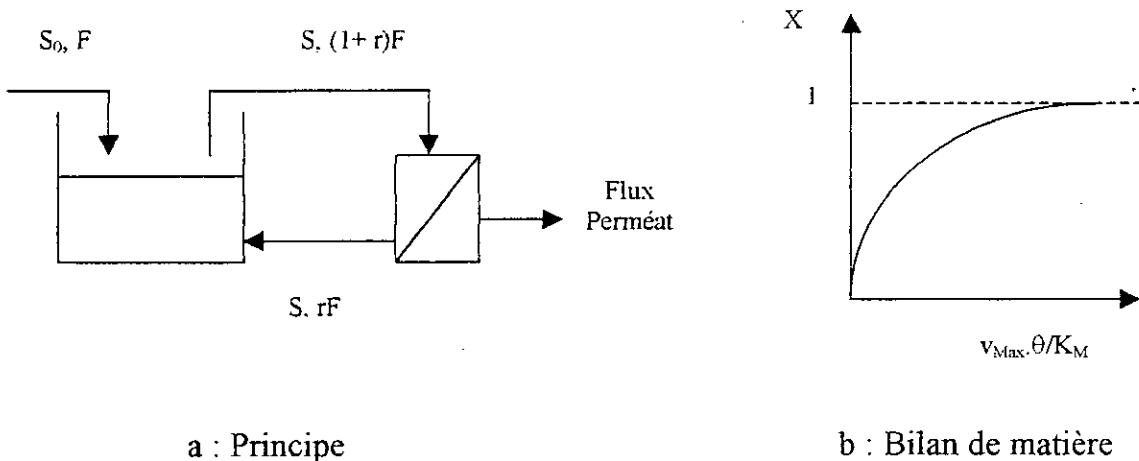


Figure 16 : Cas d'un réacteur couplé à l'ultrafiltration

Une partie est alors recyclée vers le réacteur, et une autre partie est recueillie à la sortie du séparateur (le perméat) [41].

Les différents débits sont :

- F : débit d'entrée dans le réacteur et débit de sortie du module d'ultrafiltration ;
- rF : débit recyclé, où r est la fraction soutirée ;
- $(1+r)F$: débit de sortie du réacteur.

Le volume réactionnel est maintenu constant et égal à V .

- ◆ Le flux d'entrée = $FS_0dt + rSFdt$
- ◆ Le flux de sortie = $FSdt + rSFdt = (1+r)SFdt$
- ◆ Le flux de disparition du substrat = $Vvdt$
- ◆ Le flux d'accumulation = Vds (en régime permanent, celui ci est nul)

◆ Le flux de création est nul.

L'équation du bilan devient :

$$F.S_0.dt + F.S.dt = (1+r)F.S.dt + v.V.dt + v.dS \quad (6)$$

$$F(S_0 - S) = v.V$$

$$v = F / V (S_0 - S) \quad (7)$$

L'équation du bilan de matière en réacteur continu couplé à un ultrafiltre est la même que celle établie pour le réacteur continu parfaitement agité simple.

Dans le cas d'une cinétique Michaelienne, la vitesse d'hydrolyse s'écrit :

$$v = v_{max} S / (S + Km)$$

L'équation (7) devient :

$$v_{max} S / (S + Km) = (S_0 - S) / \theta \quad \text{avec } \theta = V/F$$

$$v_{max} \theta / Km = XS_0 / Km + X / (1 - X) \quad \text{avec } X = (S_0 - S) / S_0$$

La représentation du taux de conversion X en fonction du nombre adimensionnel $v_{max} \theta / Km$ permet la détermination du temps de séjour minimal, qui assure un taux de conversion maximal proche de 1 (figure 16.b).

Chapitre V

L'ultrafiltration

V-1/ PRINCIPE DE L'ULTRAFILTRATION :	40
V-2/ MEMBRANES D'ULTRAFILTRATION :	41
V-3/ LES DIFFÉRENTS MODES D'ULTRAFILTRATION :	41
V -3-1/ ULTRAFILTRATION EN MODE DISCONTINU :	41
V-3-2/ ULTRAFILTRATION EN MODE CONTINU :	42
V-3-3/ DIAFILTRATION :	42
V-4/ MÉCANISME DE TRANSFERT DU PÉRMEAT :	42
V-4-1/ MODÈLE DE TAMIS MOLÉCULAIRE :	42
V-4-2/ MODÈLE DU FILM :	44
V-4-3/ MODÈLE OSMOTIQUE :	45
V-5/ COLMATAGE DES MEMBRANES :	45

L'ultrafiltration

Les procédés à membranes sont des techniques avantageuses du point de vue énergie, rapidité, et économie. Elles apportent un moyen de purification efficace, sans générer de pollutions supplémentaires.

Ces procédés se sont imposés de plus en plus dans des secteurs tels que l'environnement et le génie biologique, car elles n'impliquent pas de changement de phase, ni d'élévation de température, elles conviennent tout particulièrement au traitement des fluides biologiques [42].

Parmi les procédés membranaires commercialisés, les plus importants sont : l'ultrafiltration, la microfiltration, l'osmose inverse, la séparation gazeuse, la dialyse, et l'électrodialyse.

V-1/ Principe de l'ultrafiltration :

L'ultrafiltration est un procédé de séparation de macromolécules en phase liquide par perméation à travers une membrane semi-perméable, sous l'action d'un gradient de pression. La fraction du mélange retenue par la membrane est le retentat, celle passée à travers la membrane (les sels, sucres et autres) constitue le perméat ou filtrat (figure 17) [43, 44]

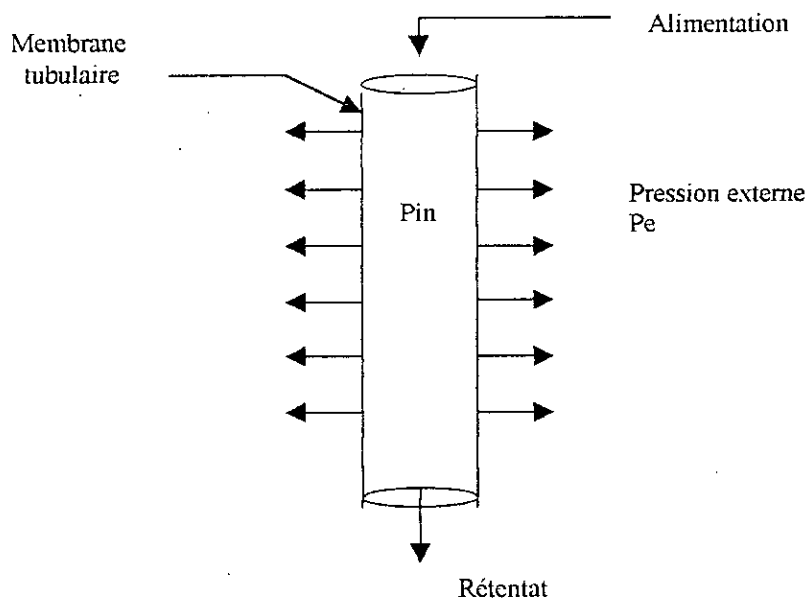


Figure 17 : Principe général de l'ultrafiltration [44].

V-2/ Membranes d'ultrafiltration :

Les membranes constituent l'élément essentiel des techniques de séparation membranaires ; elles sont classées en deux catégories correspondant à leur structure : membranes minérales et membranes organiques.

Parmi les membranes organiques utilisées : les polycondensats aromatiques : elles présentent beaucoup d'intérêt, elles résistent aux fortes températures, et aux pH extrêmes [43, 45].

Les membranes minérales connaissent un développement plus important et présentent l'avantage d'être résistantes aux agents chimiques .De plus, elles ont une grande stabilité thermique (400°C), et une bonne résistance aux grandes pressions (20 à 30 bar) [42, 43].

Les plus connues sont les membranes CARBOSEP, formées d'oxyde de zirconium supporté sur du carbone graphite. Elles peuvent ultrafiltrer des solutions visqueuses, et sont insensibles aux oxydants et aux attaques bactériennes, d'où leurs applications intensives dans les bioréacteurs à membranes [42,43].

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

V-3/ Les différents modes d'ultrafiltration :

L'ultrafiltration s'effectue de trois manières différentes :

V -3-1/ Ultrafiltration en mode discontinu :

Le mode discontinu est souvent utilisé, le retentat est recirculé vers un réservoir, et le concentrat est retenu par la membrane (figure 18) [42] .

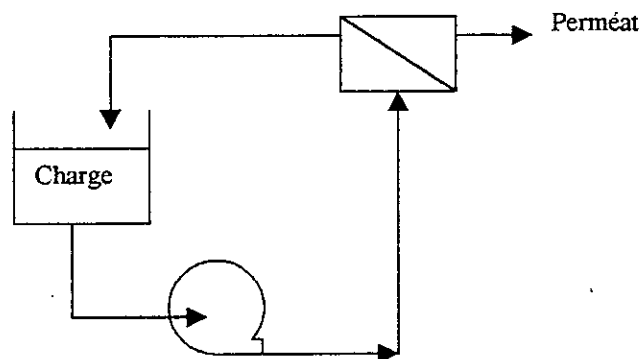


Figure 18 : Ultrafiltration en mode discontinu [43]

V-3-2/ Ultrafiltration en mode continu :

Le retentat n'est pas recyclé; il est continuellement extrait. Une deuxième pompe recircule une partie du retentat et de la solution à ultrafiltrer vers la membrane, le perméat est recueilli de manière continue; le débit d'alimentation doit être égal à la somme des débits du perméat et du retentat (figure 19) [42].

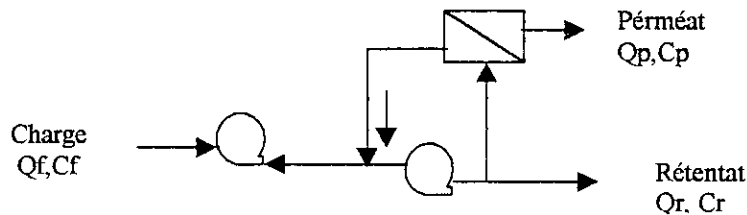


Figure 19 : Ultrafiltration en mode continu [42]

V-3-3/ Diafiltration :

Le mode diafiltration est similaire au mode discontinu, mais le volume du perméat est remplacé à taux constant par un même volume de solvant, les molécules et les cellules sont ainsi purifiées (figure 20) [43].

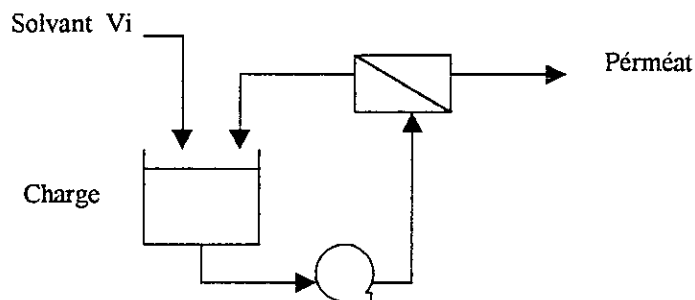


Figure 20 : Diafiltration [42]

V-4/ Mécanisme de transfert du perméat :

Différents modèles contribuent à décrire les phénomènes de transfert de matière en ultrafiltration :

V-4-1/ Modèle de tamis moléculaire :

La membrane est assimilée à un ensemble de pores symétriques identiques, le flux du solvant J_v est proportionnel à la pression ΔP et obéit à la loi de Hagen-Poiseuille : [46, 47] :

$$J_v = \frac{N \cdot \Pi \cdot (r_p)^4}{8 \cdot \eta \cdot e} \Delta P \quad (9)$$

où J_v : le flux du perméat (l/h. m²) ;
 r_p : rayon moyen des pores (m) ;
 η : viscosité dynamique du perméat (bar/s) ;
 e : épaisseur de la membrane (m) ;
 N : nombre des pores ;
 ΔP : pression transmembranaire..

Cette loi a été simplifiée par Darcy :

$$J_v = L_p \cdot \Delta P \quad (10)$$

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

La figure 21 représente l'évolution du flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire pour un solvant pur (courbe 1) et pour une solution de macromolécules (courbe 2)[47].

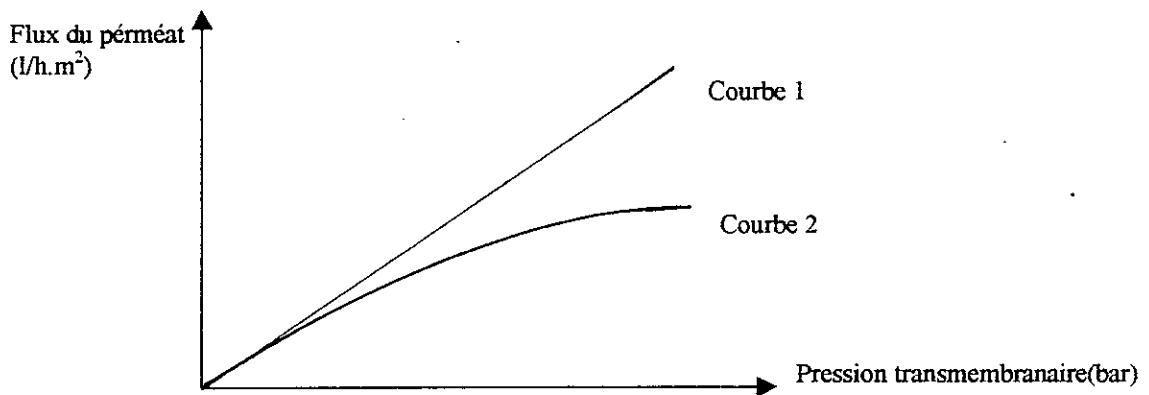


Figure 21 : Evolution du flux du perméat en fonction de la pression transmembranaire [46].

La courbe 1 est linéaire, elle obéit à la loi de Darcy, ce qui n'est pas le cas pour la courbe 2 (solution complexe) où le flux est plus faible, et ne varie plus linéairement avec la pression. Ceci est dû à l'accumulation des molécules de soluté au voisinage de la membrane [47].

V-4-2/ Modèle du film :

Le fluide à traiter s'écoulant tangentiellement à la membrane, il se crée à l'interface une couche concentrée de matière avec écoulement laminaire du fluide, c'est la couche de polarisation de concentration. Dans cette zone, les solutés retenus s'accumulent réversiblement et deux types de transport se produisent en sens inverse et simultanément, dans le sens radial (figure 22) [46] :

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

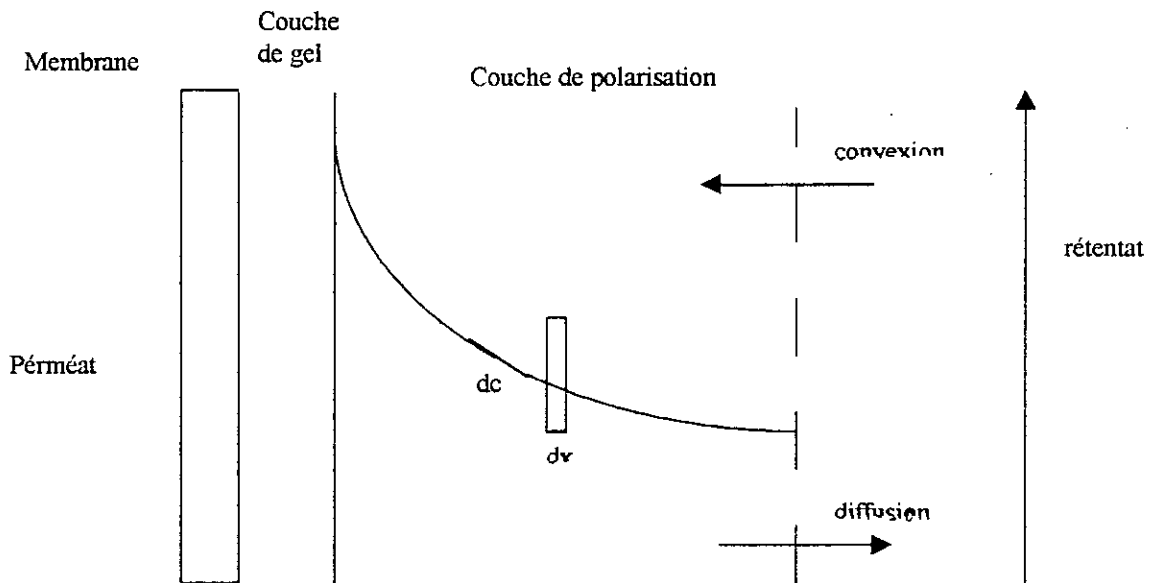


Figure 22 : Modèle du film [44].

Lorsque ces deux phénomènes s'équilibrent, on peut écrire :

$$J_p (C - C_p) = D \cdot dc / dx \quad (11)$$

Avec D : Diffusivité locale du soluté (m^2/s)
 dc / dx : Gradient de concentration du soluté ($kg/m^3 / m$)

l'intégration de l'équation (11) conduit à :

$$J_p = D / \delta \cdot \ln (C_m - C_p) / (C_r - C_p) = K \cdot \ln (C_m - C_p) / (C_r - C_p) \quad (12)$$

où δ : Epaisseur de la couche de diffusion ;
 K : Coefficient de transfert de matière ;
 C_m : Concentration de soluté à la surface de la membrane.

Si cette concentration atteint une valeur C_g , correspondant à la saturation, les macromolécules forment un gel, source d'une résistance supplémentaire au transfert de matière. A ce stade, une élévation de pression est sans effet sur le flux de perméat, elle ne fait qu'amplifier l'apport des solutés à l'interface avec pour conséquence un épaissement du dépôt de gel [48].

V-4-3/ Modèle osmotique :

Les hypothèses émises lors de l'établissement de ce modèle (figure 23) sont [48, 49] :

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

De ces hypothèses, on aura :

$$J = \Delta P_{\text{eff}} / \mu R_d = (\Delta P - \Delta \Pi) / \mu R_m \quad (13)$$

Où μ : Viscosité dynamique (Pa/ S) ;
 J : densité du flux de solvant ($\text{m}^3/\text{m}^2\text{s}$) ;
 R_m : Résistance de la membrane propre (m^{-1}).

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

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

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

V-5/ Colmatage des membranes :

Le colmatage des membranes est le principal problème rencontré en ultrafiltration. Il se manifeste par une diminution du débit de perméat recueilli, et a pour conséquence négative des coûts de nettoyage élevés.

Le colmatage est une modification des propriétés filtrantes de la membrane en cours d'utilisation à la suite du dépôt ou de l'adsorption de matières. Cette modification peut être réversible si elle disparaît après l'arrêt de la filtration ; ou irréversible s'il est

nécessaire de procéder à un nettoyage hydraulique ou chimique pour restaurer les propriétés initiales [42].

Le colmatage peut être d'origine [46] :

- Physico-chimique : adsorption de molécules sur le matériau membranaire, à la surface ou dans les pores (limite de solubilité atteinte dans la couche de polarisation);
- Mécanique : dépôt de particules, blocage de certaines espèces dans les pores du réseau membranaire ou les rugosités de la surface.

Il existe des techniques de décolmatage en continu telles que l'utilisation de promoteurs de turbulence ou de champs électriques, l'inversion de flux ou « back-flushing »...

Partie Expérimentale

*Lorsqu'un théoricien trouve un résultat nouveau
personne n'y croit sauf lui ;
et lorsqu'un expérimentateur trouve un résultat
nouveau, tout le monde y croit sauf lui.*

(Jean Le Maître)

Chapitre VI

Caractérisation et prétraitements des grignons d'olive

INTRODUCTION :	48
VI-1/ MODE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT :	48
VI-1-1/ MATÉRIELS ET MÉTHODES :.....	48
VI-2/ DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES DU SUBSTRAT :	48
VI-2-1/ MATÉRIELS ET MÉTHODES :.....	48
VI-2-2/ RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS :.....	49
VI-3/ LES PRÉTRAITEMENTS DES GRIGNONS D'OLIVE :	50
VI-3-1/ MATÉRIELS ET MÉTHODES :.....	50
VI-3-2/ RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS :.....	51
A/ OPTIMISATION DES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES DU PRÉTRAITEMENT CHIMIQUE :.....	51
B/ INFLUENCE DU PRÉTRAITEMENT À LA SOUDE SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DES GRIGNONS D'OLIVE:.....	53
CONCLUSION :	54

Caractérisation et prétraitements des grignons d'olive

Introduction :

Avant d'entamer l'étude de l'hydrolyse enzymatique des grignons d'olive dans un réacteur discontinu et dans un réacteur continu à membrane, nous avons jugé nécessaire de déterminer le mode de préparation du substrat, ses caractéristiques chimiques, et ses prétraitements.

VI-1/ Mode de préparation du substrat :

VI-1-1/ Matériels et méthodes :

Le grignon d'olive a été prélevé au niveau de la région de Tadmait, durant la campagne oléicole 1995-1996.

L'échantillon prélevé est constitué de pulpes et de fragments de noyaux; il a été conditionné dans des sacs en plastique, puis traité comme suit :

- Séchage : L'échantillon a été séché à 70 °C pour une meilleure conservation ;
- Broyage : Il a été ensuite finement broyé par un moulin de type RETCH, puis par un broyeur à mâchoire « Fritsch pulverisette » type 02.102, N°4297, 220 volt.
- Tamisage : La poudre obtenue a été tamisée par un tamis de granulométrie égale à 460µm.

VI-2/ Détermination des caractéristiques chimiques des grignons d'olive :

VI-2-1/ Matériels et méthodes :

a) Humidité : c'est le rapport exprimé en pourcentage du poids de l'eau contenue dans un matériau, au poids du solide sec. Le substrat de masse M_0 est séché dans l'étuve à une température de 110°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante M_1 . L'humidité est calculée par la relation suivante :

$$H = (M_0 - M_1) / M_0$$

b) Matière sèche : c'est le résidu obtenu après séchage à 110°C :

$$MS = 100 - H$$

c) Cendres totales : c'est le résidu obtenu après calcination à 550°C du substrat déjà séché.

La détermination des éléments minéraux est réalisée par photométrie de flamme.

d) Matières grasses : la teneur en matières grasses est déterminée par pesée, après extraction à l'éther de pétrole et séchage à l'étuve durant 48 heures.

e) Matières azotées totales : elles sont déterminées par la méthode de Jeldahl. Letaux des protéines est obtenu en multipliant la teneur en azote total par le facteur conventionnel 6,25.

f) Cellulose brute : elle est déterminée par la méthode de WEENDE (annexe 1). Elle correspond au résidu organique insoluble obtenu après attaque acide (H_2SO_4 0,26N) et alcaline (NaOH 0,31N) du substrat.

g) Composés pariétaux : la teneur en composés pariétaux (cellulose, hemicellulose et lignine) est déterminée par la méthode de Van-Soest (annexe 2).

Cette technique permet d'isoler successivement trois résidus :

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

VI-2-2/ Résultats et interprétations :

Les caractéristiques chimiques des grignons d'olive sont regroupées dans le tableau ci dessous :

Tableau 7 : Caractérisation chimique des grignons d'olive en % de la matière sèche.

Matière sèche	89,11
Matières organiques	95,22
Matières grasses	11,73
Cendres totales	4,78
Matières azotées totales	7,32
Cellulose brute	46,20
Hemicellulose	23,83
Lignine	19,89

Les teneurs moyennes en éléments minéraux : potassium, calcium, et sodium sont données dans le tableau qui suit :

Tableau 8 : Teneur en éléments minéraux (% de la matière sèche)

Elément	Teneur
Potassium	0.098
Calcium	0.37
Sodium	0.19

Sur la base de la composition chimique de Weende, et comparativement aux autres aliments grossiers (paille, foin), les grignons d'olive ont une teneur en constituants pariétaux inférieure à celle de la paille et du même ordre de grandeur que celle du foin. L'utilisation de la méthode de fractionnement de VAN SOEST, met en relief la singularité de ce sous-produit, car malgré un contenu cellulaire et une teneur en matières azotées totales favorables, ce résidu possède une valeur nutritionnelle et énergétique très faibles.

Ainsi, la faible valeur nutritive des grignons d'olive n'est, dès lors, due qu'à leur nature lignocellulosique (90% de l'azote total est lié à la fraction lignocellulosique) et à la détérioration de la fraction azotée durant les processus technologiques (extraction de l'huile, séchage des grignons).

La fraction carbohydrates (cellulose et hemicellulose) est très importante et fera l'objet de notre étude, c'est cette partie du complexe lignocellulosique qui sera la cible de l'attaque enzymatique.

VI-3/ Les prétraitements des grignons d'olive :

VI-3-1/ Matériels et méthodes :

- Prétraitement physique : Il consiste à broyer le substrat et le tamiser .
- Prétraitement chimique : Les conditions habituelles de ce prétraitement sont : une concentration de soude de 8 à 12%, exprimée par rapport à la matière sèche mise en œuvre, maintien de la température entre 80 et 120°C pendant une durée de 60 à 120mn.

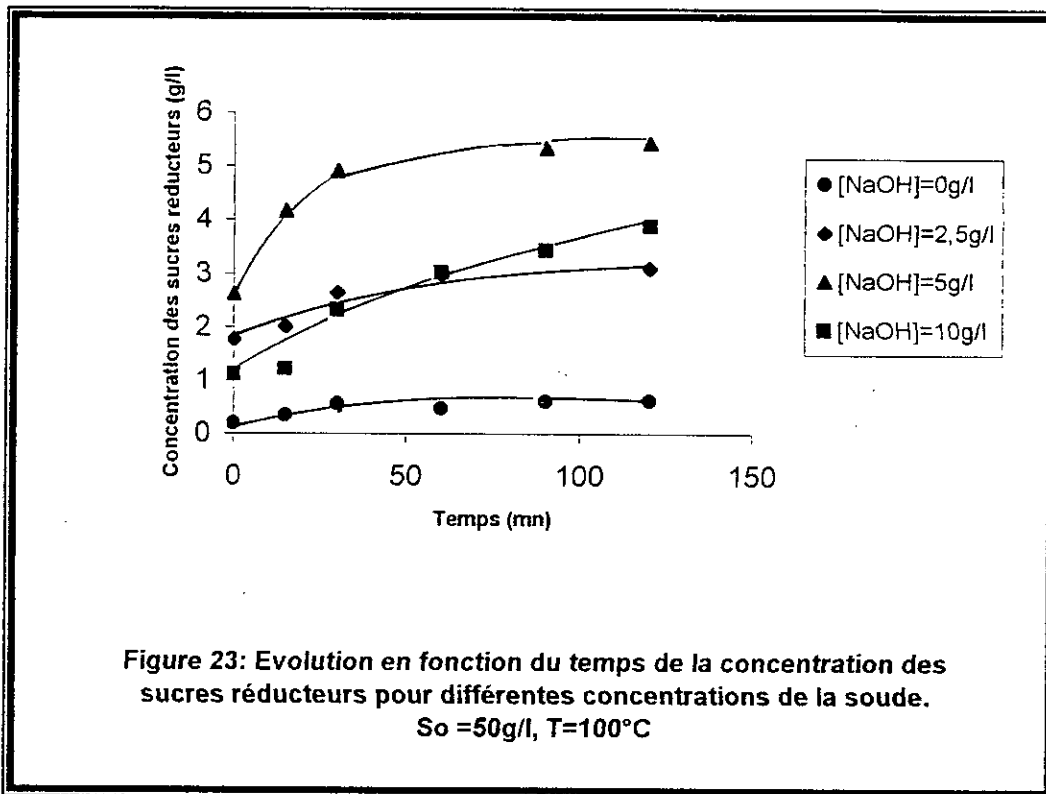
Pour optimiser les paramètres physico-chimiques cités ci-dessus, nous avons procédé comme suit :

- Concentration de la soude varie de 0 à 0,2 g par g de grignon d'olive;
- Concentration des grignons varie de 50 à 200 g par litre de solution ;
- Température varie de 50 à 120°C ;
- Durée du prétraitement varie de 0 à 120 mn.

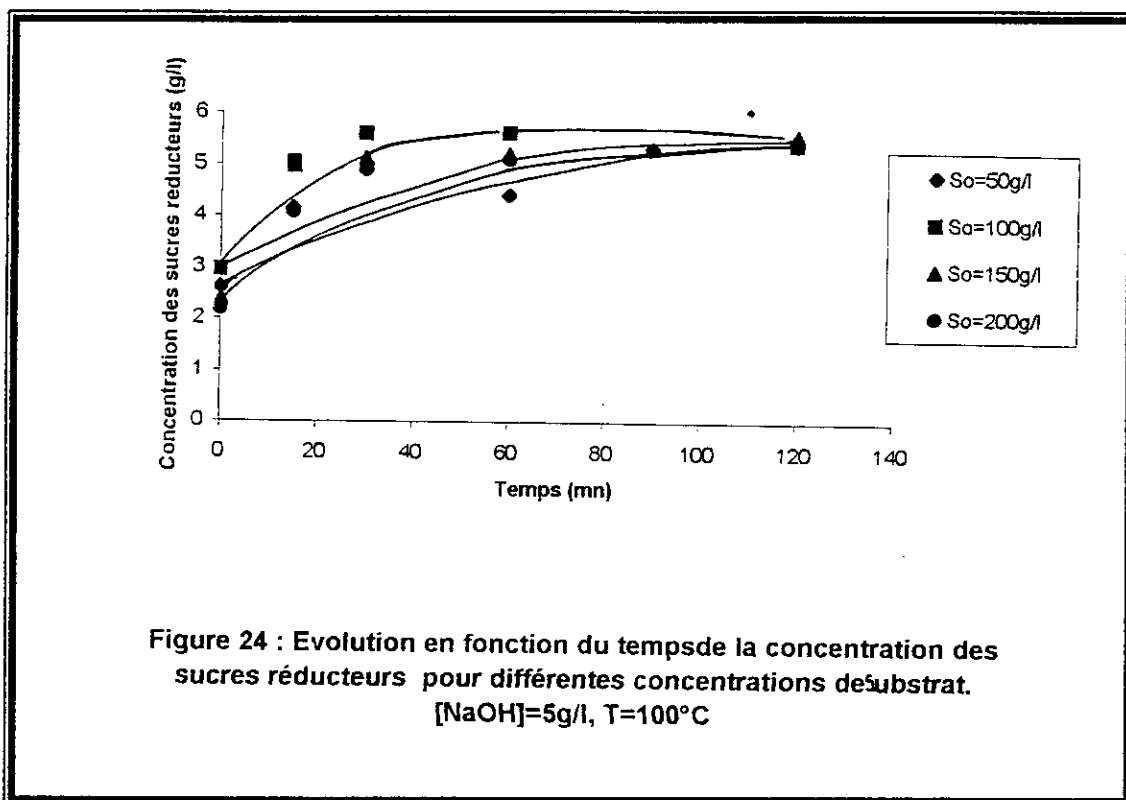
VI-3-2/ Résultats et interprétations :

A/ Optimisation des paramètres physico-chimiques du prétraitement chimique :

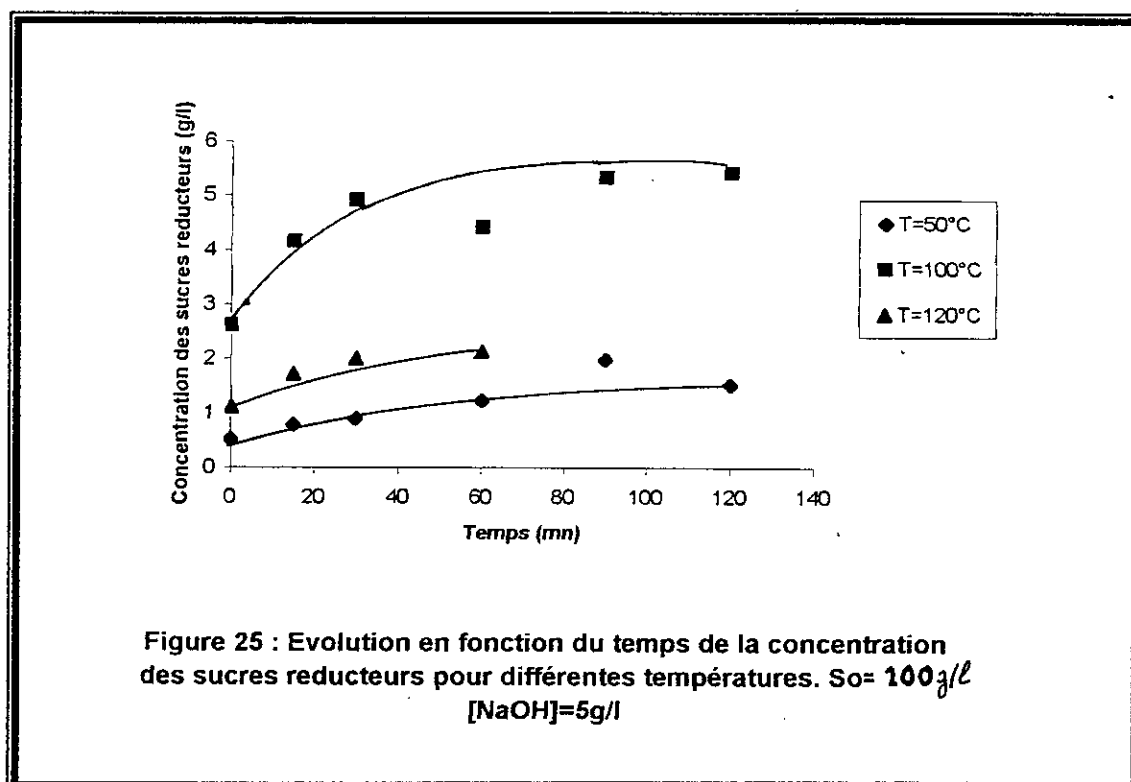
- ◆ La figure 23, illustre l'évolution au cours du temps de la concentration des sucres réducteurs en fonction de la concentration de l'alcali . Nous constatons que plus la concentration de la soude est élevée et plus la concentration des sucres réducteurs augmente et atteint une valeur maximale à la concentration de 5g /l de NaOH, cette dernière permet de solubiliser la plus grande partie des hémicelluloses .



- ◆ La figure 24, représente l'évolution en fonction du temps de la concentration des sucres réducteurs pour différentes concentrations de grignons d'olive. Nous remarquons que l'augmentation de la concentration du substrat jusqu'à 200 g/l, ne fait augmenter que faiblement la concentration du produit. Nous avons alors opté pour une concentration de l'ordre de 100g/l de grignons, afin d'éviter les limitations de transfert de matière dues à la forte densité du milieu.



- ◆ Les résultats expérimentaux relatifs à l'effet de la température sur la concentration des sucres réducteurs sont représentés par la figure 25. Nous constatons que l'action de la soude est lente à basse température, par contre elle devient rapide en présence de la chaleur. La température de 100°C donne le meilleur résultat.



- ◆ D'après les figures 23, 24, 25, nous constatons qu'une durée de traitement de une heure suffit pour atteindre les concentrations les plus élevées des sucres réducteurs.

Les mécanismes de l'action des alcalis sur les constituants pariétaux ne sont pas totalement élucidés, et plusieurs informations sont déduites des traitements plus drastiques appliqués dans l'industrie du papier.

Dans le complexe lignocellulosique, les constituants: cellulose, hémicellulose, et lignine forment une matrice très résistante à l'attaque enzymatique. Plusieurs auteurs ont mis en évidence la liaison entre la lignine et les composés pariétaux, et en particulier entre la lignine et les hemicelluloses. Ces composés et les ponts d'hydrogène formés à l'intérieur des chaînes glucidiques détruisent le pouvoir de dilatation de la cellulose et empêchent les micro-organismes et les grandes molécules comme les enzymes d'accéder à la cellulose. Seuls les composés de faible poids moléculaire peuvent encore y pénétrer [50,51].

Selon Feist W. [52], Berger L. [53], et Ford W. [54], Le grossissement et la dilatation des parois constituent la première étape de l'action de l'alcali.

A température élevée, les parois cellulaires continuent à grossir jusqu'à ce que les cellules se séparent et que les liaisons soient rompues. Par ailleurs, il y aurait une saponification des liaisons éther, formées entre les acides acétiques et phénoliques et les polysaccharides et/ou la lignine, soit l'hemicellulose et la lignine.

De plus, sous des conditions de température élevée, la lignine subit une série de réactions sous l'action de l'alcali, dont la plus importante serait la rupture des liaisons entre les unités phenyl propane avec formation concomitante de groupes phénoliques libres de faible poids moléculaire. E. M. DUSTERHOFT et G. VORAGEN [55], ont montré que 40 à 70% de lignine est solubilisée par l'alcali, et que l'efficacité du traitement à la soude dépend de la nature du matériel lignocellulosique à traiter.

B/ Influence du prétraitement à la soude sur la composition chimique des grignons d'olive :

Les résultats de l'analyse chimique du grignon d'olive traité à la soude aux conditions opératoires optimales (concentration de la soude de 5 g/l, concentration de grignons d'olive de 100g/l, température de traitement de 100°C et une durée de traitement de 1 heure), sont présentés dans le tableau 9 :

Tableau 9 : Composition chimique du grignon d'olive traité et non traité (en % de la matière sèche)

	Grignon non traité	Grignon traité
Matière sèche	89,11	84,22
Cendres totales	4,78	10,28
Matières grasses	11,73	8,94
Matières azotées totales	7,32	6,67
Cellulose brute	46,20	42,53
Potassium	0,198	0,17
Sodium	0,19	0,151
Hemicellulose	23,83	10,25
Lignine	19,89	13,07

Nous constatons que le grignon traité présente une teneur élevée en cendres totales. Selon NEFZAOUI [7], ceci résulte probablement d'un lavage des olives peu efficace et des conditions climatiques mauvaises au moment de la cueillette.

Le traitement à la soude fait diminuer les teneurs en hémicellulose et en lignine de 13% et de 6% respectivement. Les diminutions des teneurs en cellulose, en matières azotées totales et en matières grasses après traitement, sont pratiquement faibles.

Ces résultats semblent être proches de ceux obtenus par AGUILERA J.F. [56] et MOSS A.R. [57].

Par ailleurs, SUSUMU et col [58], en appliquant un traitement à la vapeur ont obtenu de meilleurs résultats.

Conclusion :

L'étude de la caractérisation chimique des grignons d'olive a montré que ce résidu est riche en carbohydrates, cible de l'attaque enzymatique, et pauvre en azote.

L'optimisation des conditions opératoires du prétraitement chimique a montré, que ce dernier est efficace aux conditions suivantes : concentration de la soude de 5g/l, concentration de substrat de 50 à 250 g/l, température de 100°C et une durée de traitement de 1 heure.

La composition chimique du grignon d'olive après prétraitement à la soude nous a permis de constater, que l'alcali agit principalement sur l'hémicellulose et partiellement sur la lignine.

Chapitre VII

Etude de la cinétique enzymatique des grignons d'olive dans un réacteur discontinu

INTRODUCTION :	56
VII-1/ MATÉRIELS ET MÉTHODES :	56
VII-1-1/ MATÉRIELS :	56
VII-1-2/ MÉTHODES :	57
VII-2/ RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS :	59
VII-2-1/ RECHERCHE DES CONDITIONS OPÉRATOIRES OPTIMALES DE L'ACTIVITÉ CELLULOLYTIQUE :	59
VII-2-2/ ETUDE DE LA DÉNATURATION THERMIQUE DE LA CELLULASE :	60
VII-2-2/ DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA CELLULASE :	62
VII-2-3/ RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE :	62
VII-2-4/ CINÉTIQUE D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE :	64
VII-2-5/ ETUDE DE L'EFFET INHIBITEUR DU CELLOBIOSE :	72
VII-2-6/ EFFET DU PRÉTRAITEMENT SUR LE RENDEMENT DE SACCHARIFICATION :	73
VII-2-7/ EFFET DU LAVAGE DU GRIGNON D'OLIVE HYDROLYSÉ SUR LE RENDEMENT DE SACCHARIFICATION : ..	74
CONCLUSION :	75

Etude de la cinétique enzymatique des grignons d'olive dans un réacteur discontinu

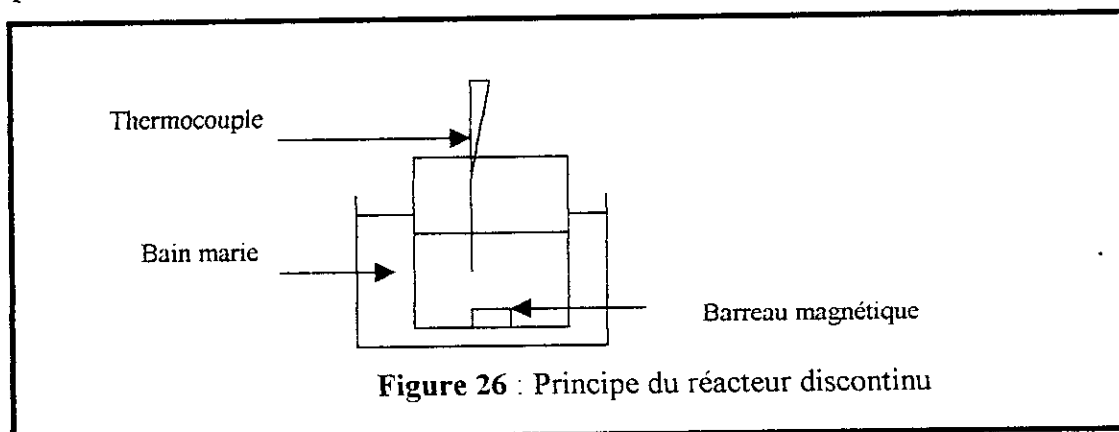
Introduction :

Les réacteurs discontinus ont un fonctionnement simple et économique. C'est la raison pour laquelle, nous avons utilisé un tel réacteur, pour déterminer grâce à des expériences à l'échelle laboratoire, des conditions d'hydrolyse transposables au réacteur continu couplé à l'ultrafiltration.

VII-1/ Matériels et méthodes :

VII-1-1/ Matériels :

Les expériences de l'hydrolyse enzymatique en mode batch ont consisté à mettre en contact, dans un réacteur (bêche) plongé dans un bain marie de température égale à 50°C et maintenu sous agitation modérée et continue à l'aide d'un barreau magnétique, des quantités données d'enzyme et de substrat (figure 26).



- ◆ Enzyme cellulolytique : une préparation enzymatique en poudre, purifiée, fabriquée par la firme SIGMA a été utilisée. C'est une cellulase EC 3.2.1.4. d'origine fongique (*Trichoderma Reesei*) dont l'activité cellulolytique est de 5,08 units/mg (Conditions CMC, pH=5, T=37°C).
- ◆ Tampon acide acétique/acétate de sodium 0,05M et pH=5 :

Les solutions stock A et B sont préparées comme suit :

A : Solution acide acétique 0,5M (28,87ml de CH_3COOH + eau pure q.s.p. 1 litre) ;

B : Solution d'acétate de sodium 0,5M (68g de CH_3COONa ou 122g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + eau pure q.s.p. 1 litre).

Pour obtenir une solution tampon 0,05M et pH=5, on mélange 37 ml de la solution A et 88 ml de la solution B et on dilue avec de l'eau distillée jusqu'à un volume total d'un litre.

VII-1-2/ Méthodes :

Dosage des sucres réducteurs : cette technique a été mise au point par BERNFELD cité dans [59], c'est une méthode basée sur la formation d'un chromatophore entre le réactif DNS et les terminaisons réductrices des molécules des sucres. En effet, à température élevée, en milieu basique et en présence des sucres réducteurs, le réactif DNS de couleur jaune est réduit en acide 3.Amino-5-nitrosalicylique (brun), et les groupements aldéhydes des sucres sont oxydés en groupements carboxyles.

Réactif DNS :

Acide dinitrosalicylique	1%
Phénol	0,2%
Sulfite de sodium	0,05%
NaOH	1%
Rochelle salt (Tartrate double de sodium et de potassium)	40%

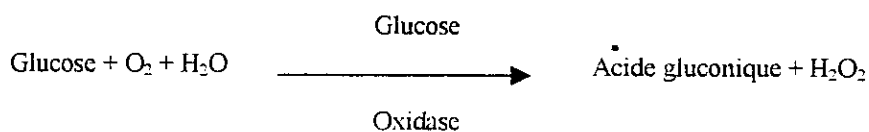
Etaion : Glucose

Les réactifs doivent être mélangés dans l'ordre indiqué ci-dessus à l'exception du Rochelle salt qui doit être préparé seul et ajouté aux échantillons après ébullition.

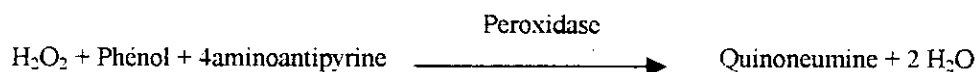
Mode opératoire : mettre 3ml d'échantillon convenablement dilué dans un tube à essai, ajouter le réactif DNS, agitez-le et plongez-le dans un bain marie bouillant pendant 5mn, ajouter alors 1ml de Rochelle salt et laissez-le refroidir, Lire la densité optique à 575 nm.

Dosage du glucose par la méthode enzymatique glucose-oxidase/peroxidase : Cette technique a été proposée par KESTON et TELLER [41]. Elle consiste en l'application d'un couple enzymatique glucose-oxidase/peroxidase. Le produit formé possède une absorbance à 510 et 550nm. Cette méthode donne des résultats en corrélation avec ceux obtenus par la méthode à l'hexokinase.

Principe :



Réactifs : Système enzymatique :



4-Aminoantipyrine	0,25 mmol/l
Glucose-oxydase (Aspergillus)	≥20000 U/l
Peroxydase	≥1000 U/l

Tampon :	
Phénol	16 mmol/l
Préservatif : Azoture de sodium	0,5 g/l

Etalon :	
Glucose	100 mg/dl (5,55 mmol/l)

Mode opératoire :

Préparer des dilutions de concentration de 1 à 4g/l à partir de l'étalon glucose. Prélever de chaque dilution 1ml, ajouter 1ml de glucose-oxydase. Lire à 510 ou à 540 nm la D.O. de chaque échantillon. La coloration est stable au moins deux heures si les échantillons ne sont pas exposés à une lumière intense.

Détermination de l'activité enzymatique : l'activité de la cellulase a été déterminée selon la méthode décrite par MANDELS, ANDREOTTI et ROCHE [60].

Mode opératoire :

Introduire dans des tubes à essai 1ml de la solution tampon Acétate 0,05 M et pH=4,8, ajouter 0,5 ml de la solution enzymatique (enzyme convenablement diluée), y introduire le papier filtre Wattman N° 1 (dimension 1x 6 cm) soit 50mg.

Deux dilutions d'enzyme doivent être utilisées, une dilution capable de libérer plus de 2mg/l de glucose et une autre capable de libérer moins de 2mg/l de glucose. Incuber à 50°C pendant une heure. Ajouter 3ml de DNS pour arrêter la réaction.

Placer les tubes dans de l'eau bouillante pendant 5 à 15mn et déterminer la quantité de sucres réducteurs en utilisant comme étalon le glucose. Inclure un essai à blanc sans papier filtre pour éliminer la quantité de sucres présents dans la préparation enzymatique.

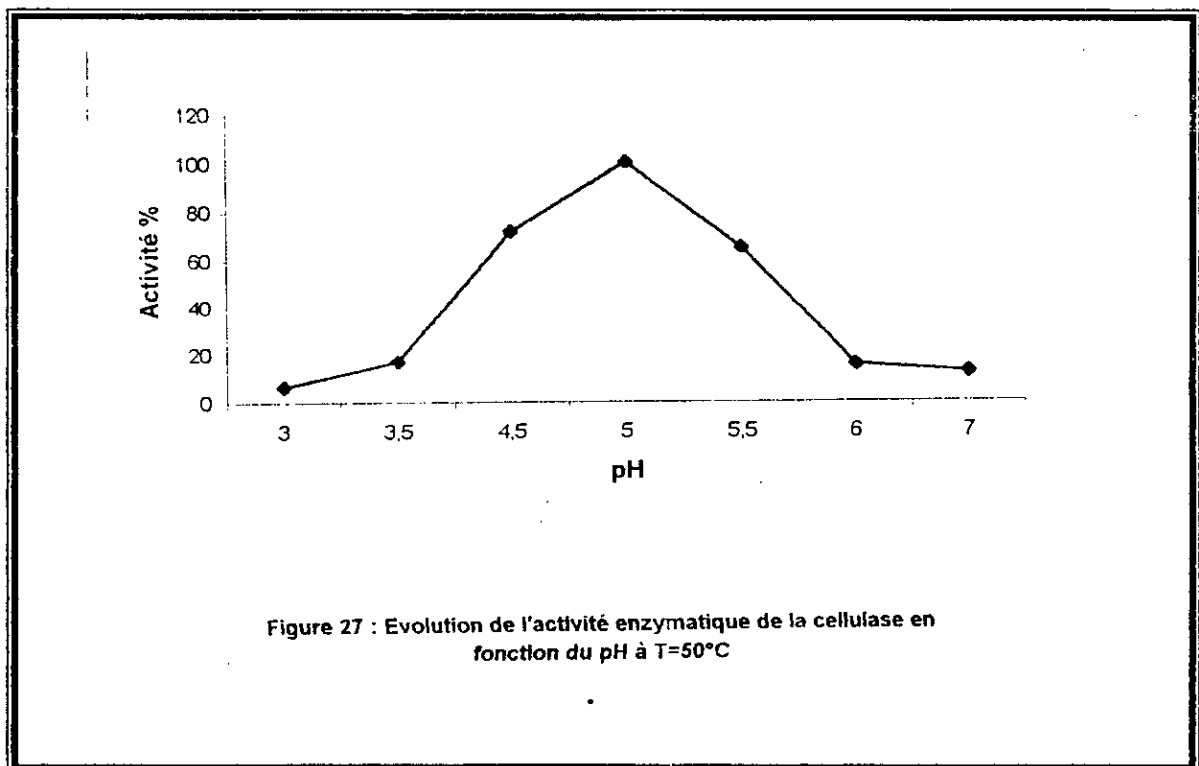
L'activité est exprimée en FPU qui est basé sur la libération de 2 mg de glucose équivalent.

VII-2/ Résultats et interprétations :

VII-2-1/ Recherche des conditions opératoires optimales de l'activité cellulolytique :

- pH: La démarche expérimentale qui nous a permis de déterminer le pH optimal de l'activité enzymatique de la cellulase est la suivante : des mesures des activités catalytiques de l'enzyme dans les conditions standards sont effectuées à différents pH (3 à 7).

Les résultats sont représentés sur la figure 27. Nous remarquons que la cellulase présente une activité catalytique maximale à pH=5.

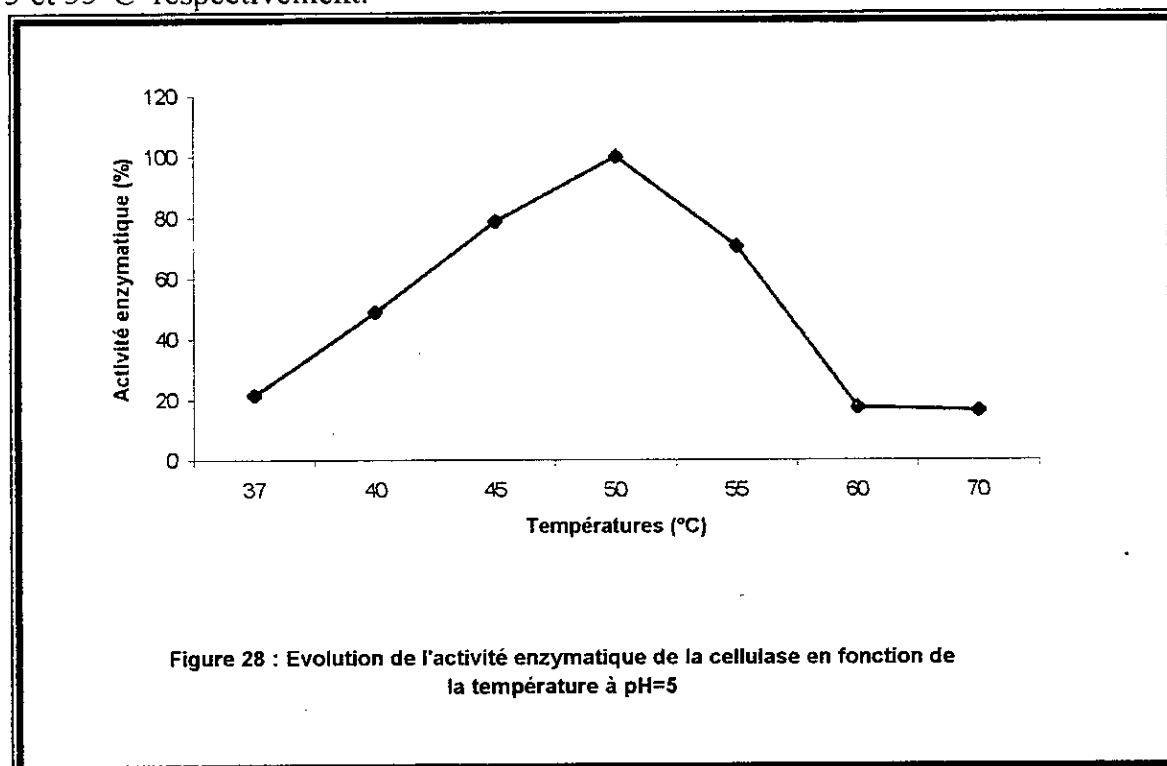


Ce résultat est conforme à celui obtenu par plusieurs auteurs; LINKO M. [61] a obtenu des valeurs de pH optimal allant de 4 à 5 pour l'activité cellulolytique des cellulases d'origine fongique, testée sur des substrats purs.

De même, VANBELLE et col [62], ont obtenu un pH optimal de l'activité cellulolytique allant de 3,8 à 5,2.

- **Température** : La même démarche citée précédemment a été suivie. Des mesures des activités catalytiques de la cellulase sont effectuées à différentes températures.

Les résultats expérimentaux représentés par la figure 28, montrent que la cellulase présente une activité maximale à 50°C et atteint 78% et 75% de cette performance à 45 et 55°C respectivement.



Pour cette enzyme, le profil décrit est proche de celui obtenu par plusieurs auteurs [63,64]; en effet les températures optima concordent.

VII-2-2/ Etude de la dénaturation thermique de la cellulase :

L'étude de la thermosensibilité de la cellulase a été effectuée sur un substrat standard (papier filtre Wattman N°1).

L'élévation de la température provoque un effet de dénaturation de la protéine constituant l'enzyme. Elle devient instable et inactive à partir d'une certaine température.

Pour évaluer cette dénaturation, un échantillon de la préparation enzymatique (0,5 mg/ml) est maintenu à une température donnée pendant plusieurs heures et régulièrement une aliquote de cet échantillon est prélevée et son activité enzymatique est mesurée dans les conditions standards. La même expérience est renouvelée à d'autres températures.

Les activités avec préchauffage de l'enzyme sont calculées et comparées à l'activité de la cellulase sans préchauffage, par le calcul des activités résiduelles (Ar) définies par la formule suivante :

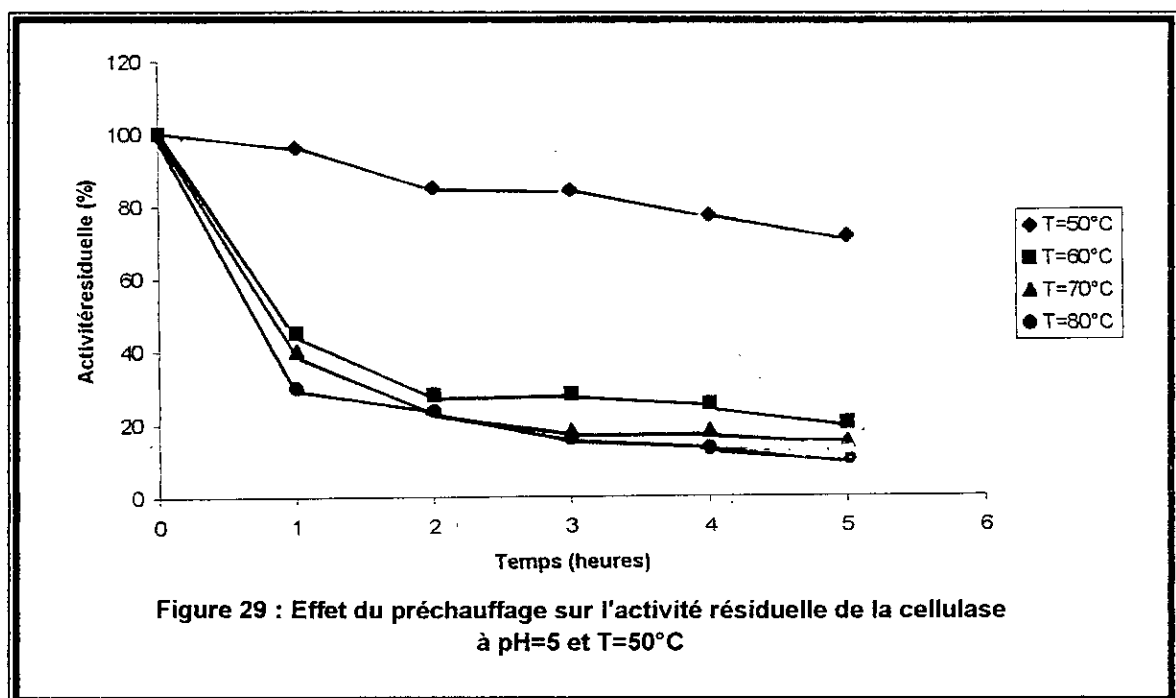
$$Ar = \frac{\text{Activité avec préchauffage}}{\text{Activité sans préchauffage}} \cdot 100\%$$

La représentation de l'évolution au cours du temps des activités de la cellulase en fonction des températures de préchauffage en figure 29, montre que la température influe fortement sur l'activité enzymatique.

Une incubation de 5 heures à 50°C ne paraît pas entraîner d'inactivation.

A 60°C, l'activité initiale est réduite de moins de 70% après cinq heures de préchauffage.

A 70°C, l'activité résiduelle au bout de cinq heures d'exposition n'est plus que de 15%. Elle chute à 7% à 80°C.



A température donnée, de nombreux facteurs influencent la vitesse de la dénaturation thermique des biocatalyseurs. La composition du milieu d'incubation (concentrations en enzyme, en substrat ou en effecteur, pH, force ionique, agitation).

Plus souvent, les protéines et certains polymères protègent les enzymes purifiées contre la dénaturation [29,65,66].

VII-2-2/ Détermination de l'activité enzymatique de la cellulase :

L'activité cellulolytique déterminée est $A=0,889$ FPU.

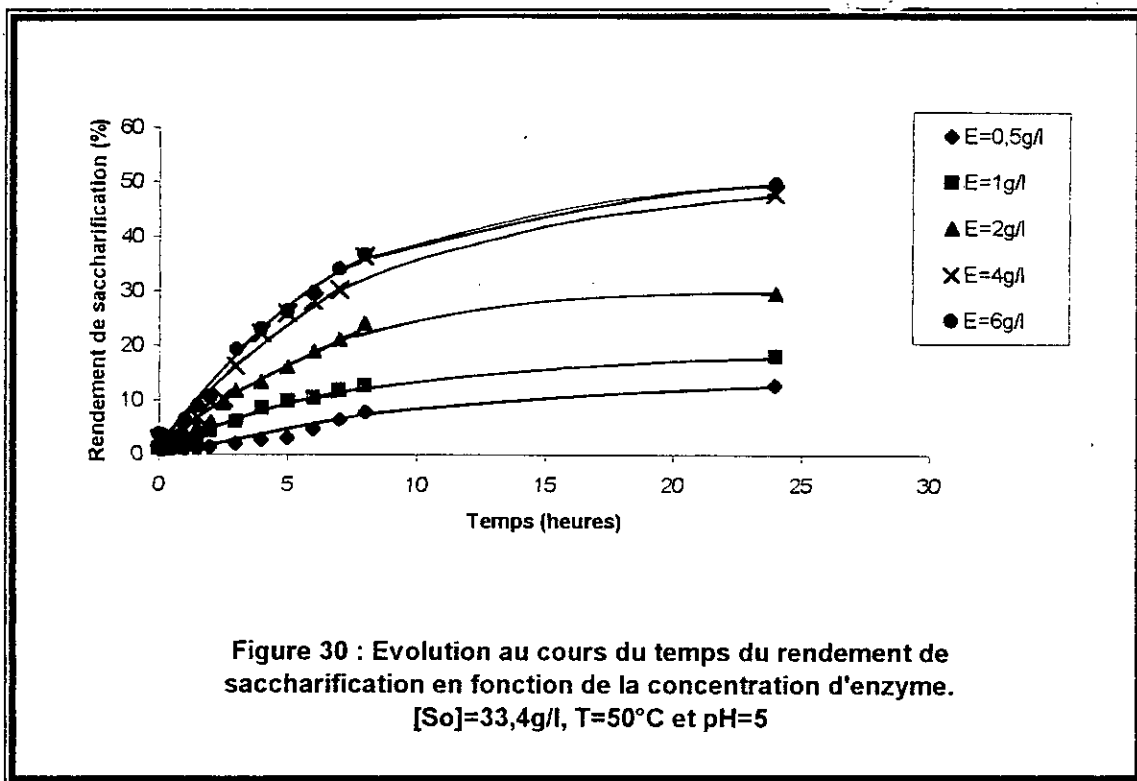
Il est à noter que l'activité enzymatique de la cellulase déterminée expérimentalement est différente de celle donnée par le fabricant de l'enzyme. Selon J.C. COLLIN et R.DELECOURT [33], la mesure de l'activité catalytique varie avec les conditions analytiques et souvent avec le substrat utilisé, surtout quand celui-ci est complexe et le grand désavantage des méthodes basées sur une mesure de l'activité enzymatique est leur dépendance totale vis à vis des conditions de la méthode.

VII-2-3/ Recherche des conditions optimales de l'hydrolyse enzymatique :

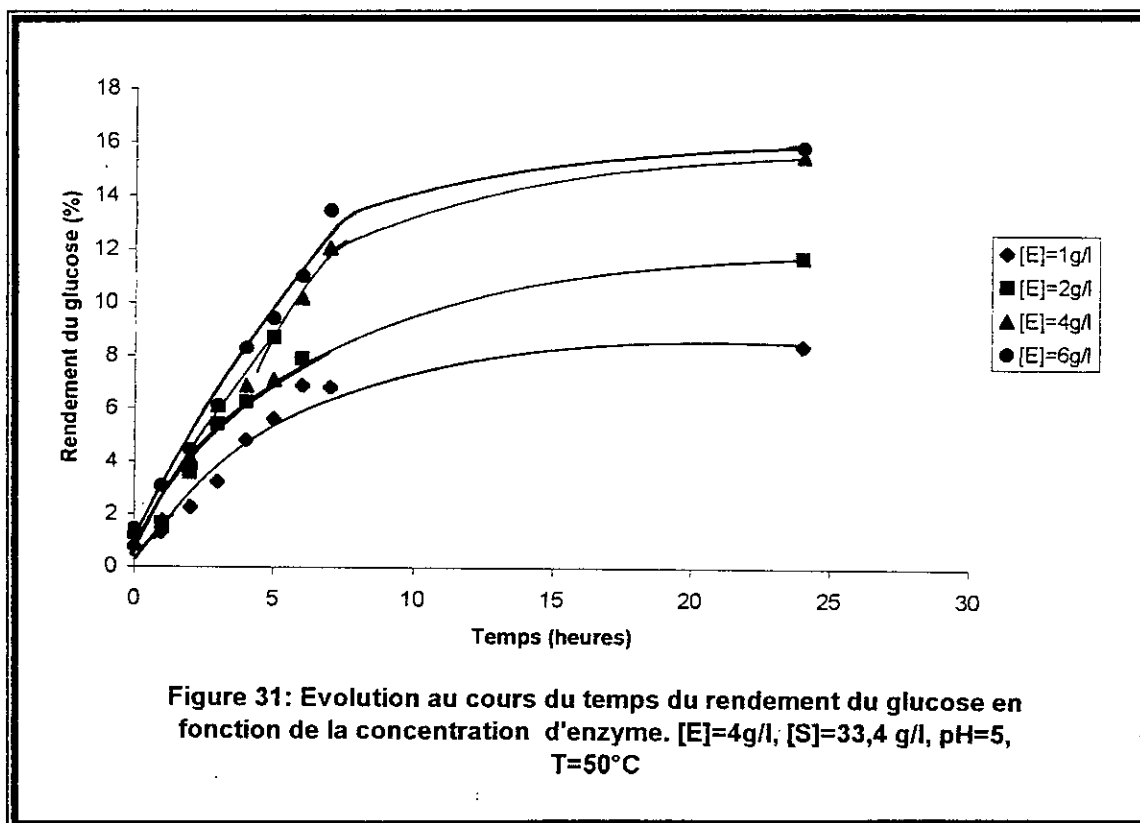
- Le pH utilisé pour cette étude est le pH optimal de l'activité cellulolytique : $\text{pH}=5$;
- La température utilisée est la température optimale de l'activité cellulolytique : $T=50^{\circ}\text{C}$
- Concentration de l'enzyme : une série d'hydrolyse a été effectuée pour différentes concentrations d'enzyme (de 0,7 à 7g/l, soit un rapport E/S de 0,06 à 0,2 gramme d'enzyme par gramme de grignon d'olive) à $\text{pH}=5$, une température de 50°C et une concentration de grignons d'olive de 33,4 g/l.

La figure 30, illustre l'évolution du rendement de saccharification en fonction du temps pour différentes concentrations d'enzyme.

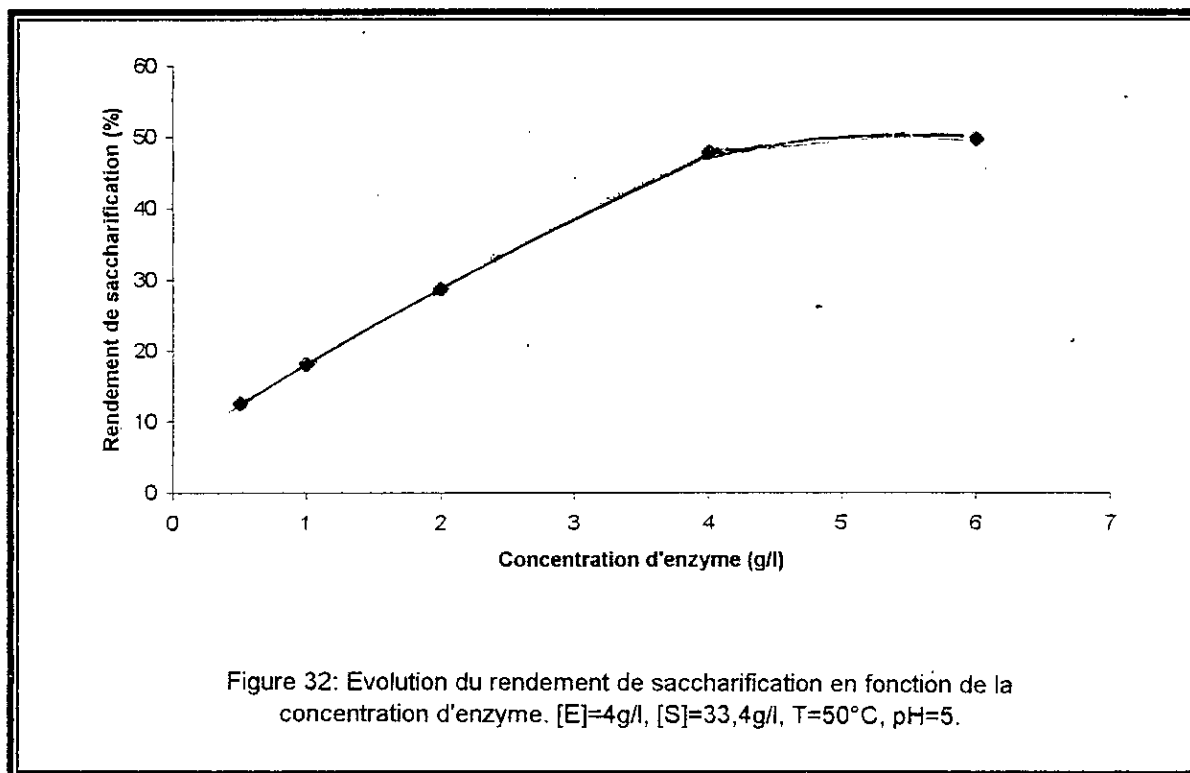
Nous remarquons que les plus hauts rendements de saccharification atteints dans ces essais sont obtenus pour des concentrations d'enzyme de 4g/l et 6g/l .



Ces mêmes quantités d'enzyme, donnent les rendements de glucose les plus élevés (figure 31).



L'évolution des rendements de saccharification (obtenus après 24 heures d'hydrolyse) en fonction de la concentration d'enzyme représentée en figure 32, montre que ces derniers sont très proches pour les quantités de cellulase 4 et 6 g/l avec un léger excès pour 6 g/l.



D'après ces résultats, 4g/l est la concentration optimale de la cellulase pour l'hydrolyse enzymatique des grignons d'olive.

Pour la suite de notre travail, nous avons donc choisi une concentration d'enzyme de 4 g/l qui paraît donner des résultats très proches de ceux obtenus à 6g/l.

VII-2-4/ Cinétique d'hydrolyse enzymatique :

De part sa complexité, son hétérogénéité et son insolubilité, l'hydrolyse de la cellulose est contrôlée par plusieurs étapes [65] :

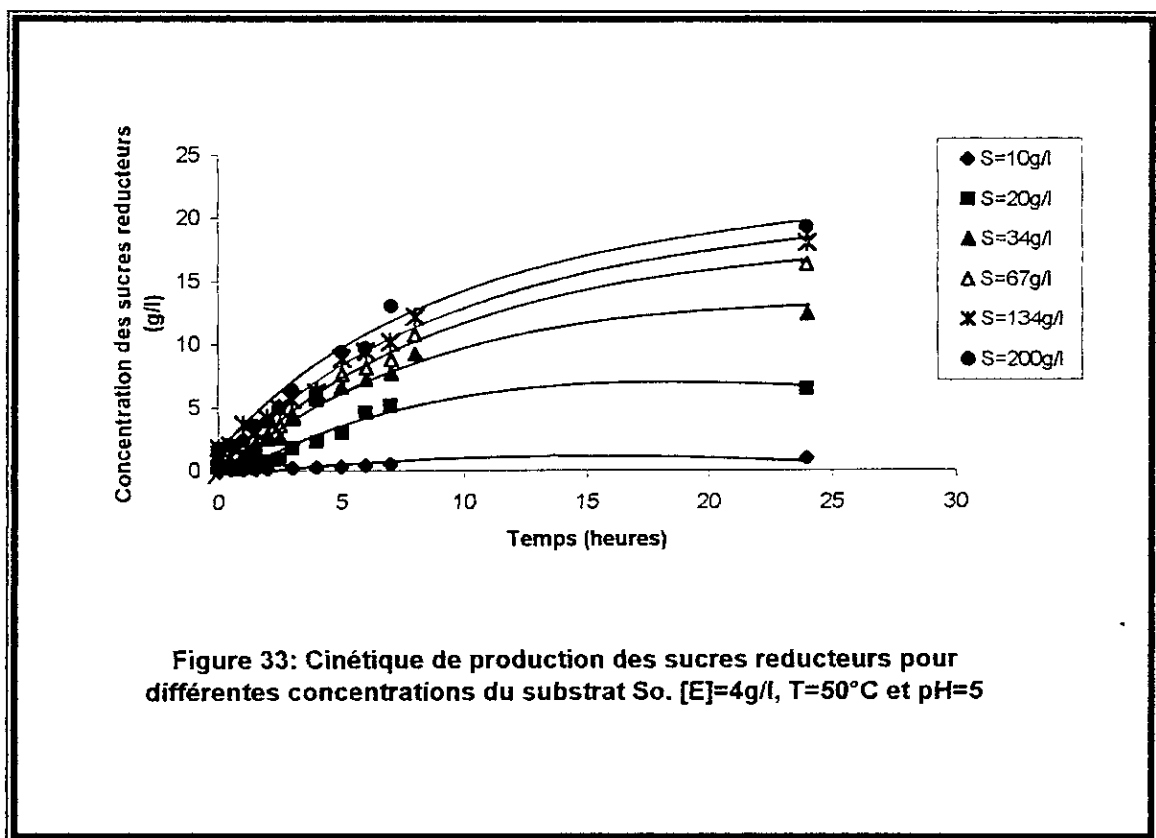
- Transfert des molécules enzymatiques de la phase liquide à la surface de la cellulose ;
- Formation d'un complexe enzyme-substrat par adsorption des molécules de l'enzyme sur la surface des particules cellulosiques ;
- Transfert des molécules du réactant -eau- au site actif du complexe ES ;
- Réaction au niveau de la surface du complexe ES entre eau et cellulose ;
- Transfert des produits solubles de l'hydrolyse (glucose et cellobiose) de la cellulose vers la phase liquide ;
- Décomposition du cellobiose en glucose dans la phase liquide.

Il a été rapporté [65], que la résistance au transfert de matière est considérablement réduite en assurant une agitation favorable pour une concentration de substrat bien déterminée. La vitesse d'agitation de la solution dans ces expériences est de 250 à 270 tours par minute.

L'expérience consistait à mesurer la vitesse initiale d'hydrolyse enzymatique (v_0) à différentes concentrations initiales en substrat (S_0). v_0 était évaluée d'après un dosage des sucres réducteurs apparus dans le milieu réactionnel.

Les conditions opératoires étant fixées : pH=5, température =50°C, concentration d'enzyme = 4g/l, la concentration des grignons d'olive varie de 10g/l à 200g/l.

Les données collectées (Figure 33) indiquent que, la concentration des sucres réducteurs augmente au début puis tend à se stabiliser après 10 heures d'hydrolyse pour chaque concentration de grignon utilisée. Ce ralentissement de la vitesse de production des sucres réducteurs, selon plusieurs auteurs, est dû à de nombreux facteurs.



YOUNG-HUNLEE et *col* [36], en étudiant la cinétique d'hydrolyse enzymatique de la paille prétraitée à la soude, ont attribué la diminution de la vitesse d'hydrolyse à plusieurs facteurs :

- ◆ Transformation de la cellulose en une forme structurale plus résistante ;
- ◆ Inhibition de l'activité enzymatique par l'accumulation de produits d'hydrolyse.

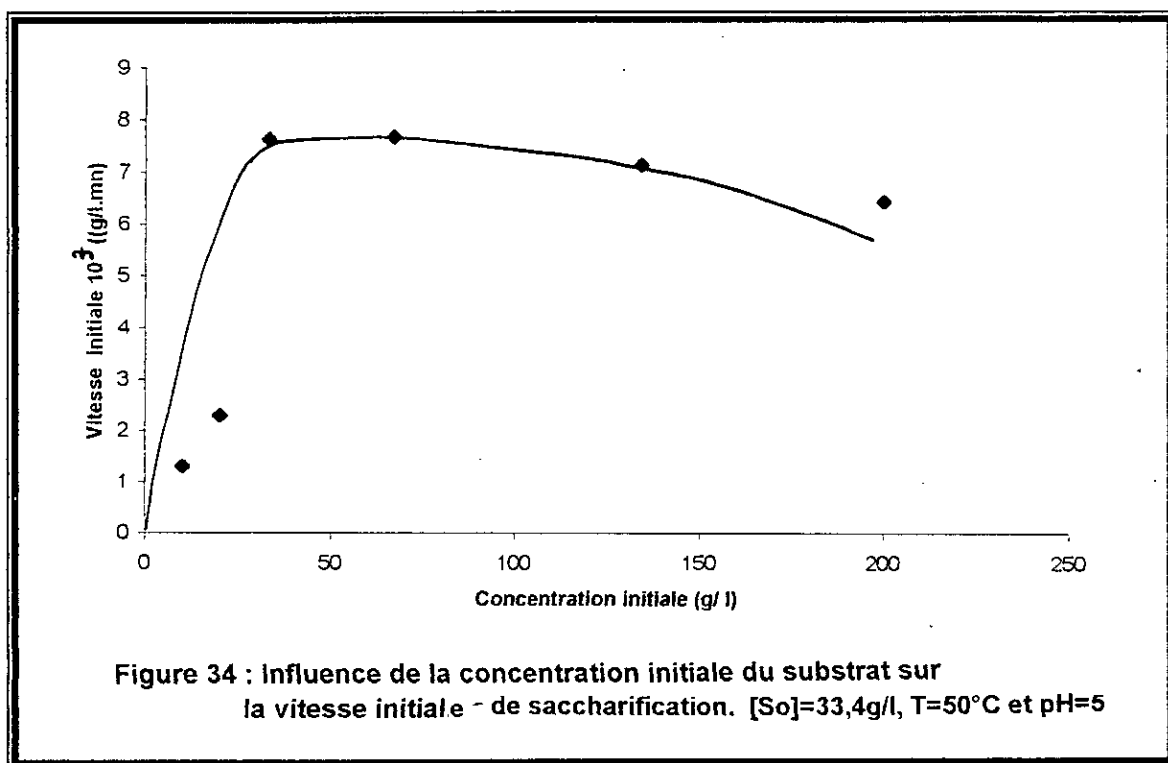
POURQUIE et *col* [11] et GUSAKOV.V. [67], ont étudié l'hydrolyse enzymatique des tiges de maïs prétraitées à la soude et ont expliqué le ralentissement de ce processus par :

- L'hétérogénéité du substrat, en effet les parties les plus facilement dégradables sont hydrolysées les premières ;
- L'inhibition par les produits de la réaction d'hydrolyse ;
- L'inactivation thermique de l'adsorption irréversible d'une partie des enzymes sur le substrat.

DESHPANDE M. et col [68], ont étudié l'hydrolyse enzymatique de la paille de blé prétraitée par l'explosion thermique ; ils ont attribué la diminution de la vitesse d'hydrolyse aux facteurs suivants :

- ◆ Les hemicelluloses et la cellulose amorphe, qui sont plus accessibles, sont hydrolysées en premier lieu et à grande vitesse ;
- ◆ La fraction ligneuse restante forme une barrière pour l'hydrolyse.

La figure 34, illustre l'évolution des vitesses initiales en fonction de la concentration des grignons d'olive introduite. Nous remarquons qu'au fur et à mesure que S_0 augmente, il y'a d'abord un accroissement de v_0 pour des concentrations S_0 allant de 10 à 33,4g/l, puis la vitesse plafonne (33,4g/l à 67g/l) et ensuite tend à diminuer pour les valeurs de S_0 allant de 67 g/l à 200g/l.

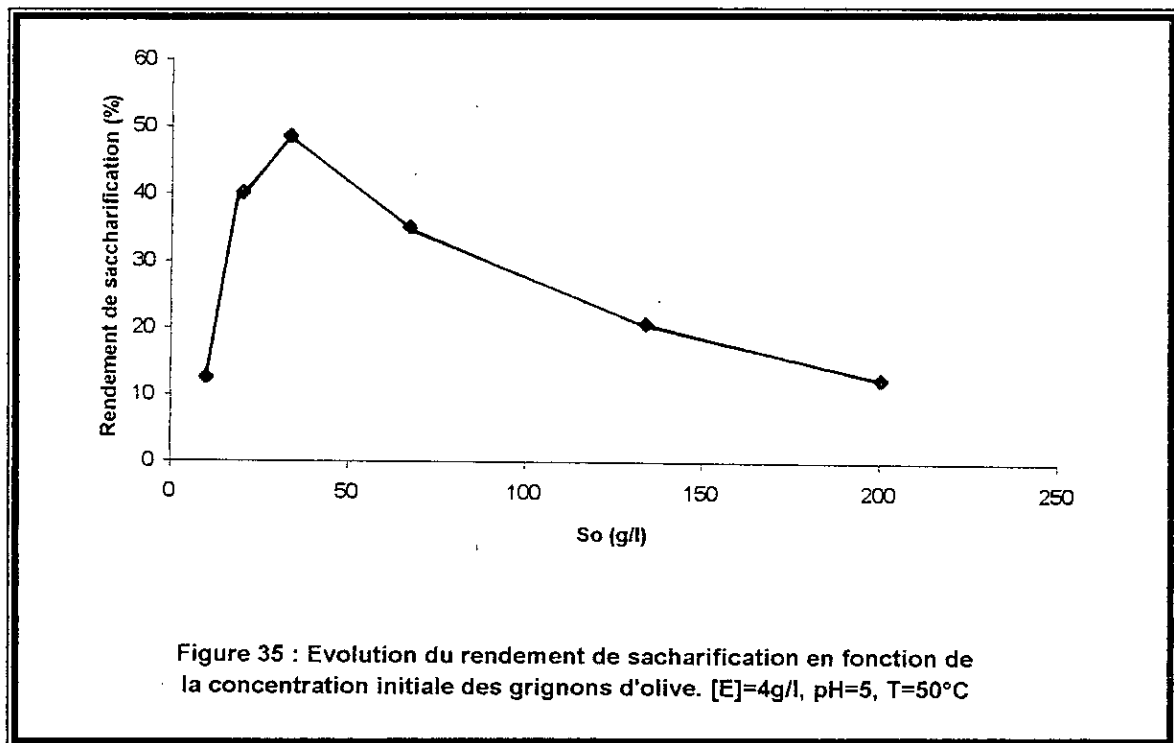


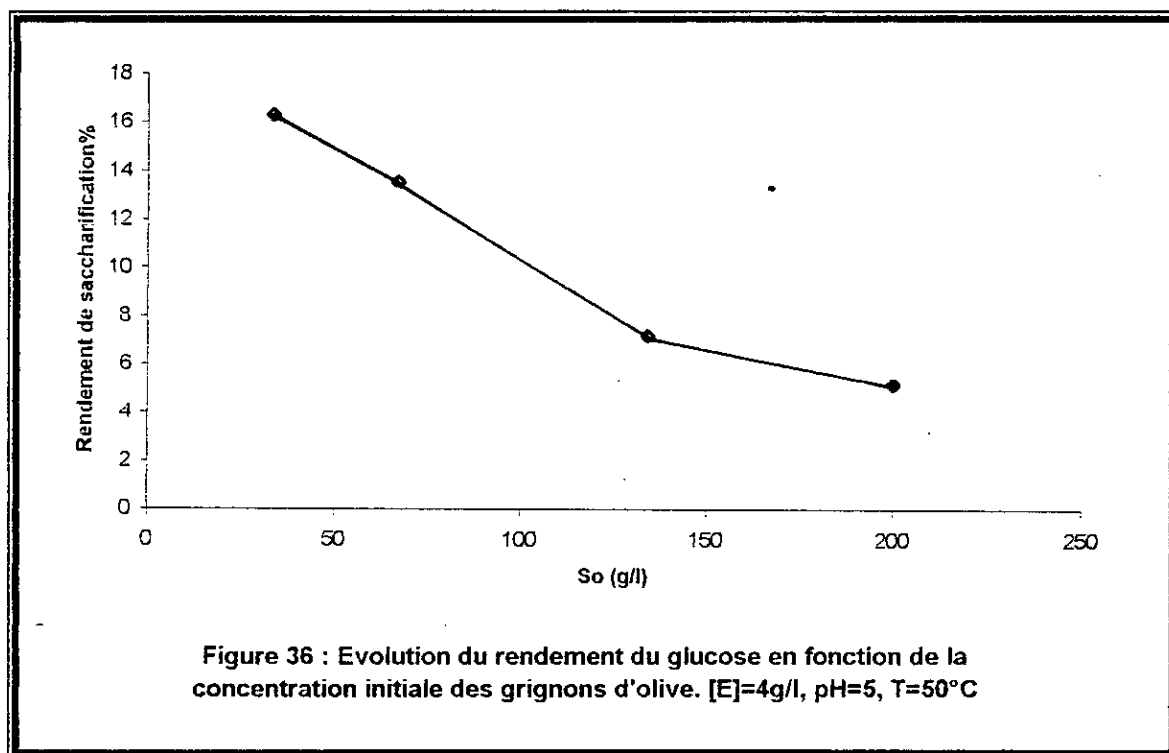
Plusieurs auteurs [23,36,37], ont attribué la diminution de v_0 aux fortes concentrations de substrat, à une inhibition de l'activité enzymatique par un excès de cellulose d'une part, et d'autre part à l'hydrodynamique du système réactionnel. En effet, YOUNG-HUYUN.L et FAN L.T [36], ont rapporté que, les particules cellulosiques sont constituées d'innombrables capillarités ou pores qui en solution, tendent à retenir des

volumes importants d'eau (taux d'humidité élevé). Ceci a pour conséquence de réduire les mouvements du système cellulose-cellulase dans la phase aqueuse, et par la même d'entraver significativement la cinétique d'hydrolyse.

Les figures 35 et 36 donnant l'évolution du rendement de saccharification global et le rendement de glucose en fonction de la concentration des grignons d'olive introduite montrent que ces deniers atteignent leurs valeurs maximales (48% et 16%) à la concentration des grignons d'olive de 33,4g/l.

Nous remarquons également que l'augmentation de la concentration des grignons d'olive de 33,4 à 200 g/l, limite le rendement de saccharification global. Cette limitation selon SCZODRAK [69], peut être due principalement aux difficultés de l'agitation et à l'accumulation de produits finaux d'inhibition.





Les meilleurs rendements d'hydrolyse que nous parvenons à atteindre sont généralement proches de ceux obtenus par d'autres expérimentateurs (Tableau 10).

En ce qui concerne le rendement de glucose obtenu, SZCZODRACK..J[69] et THOMAS H. et *col* [70], ont obtenu des résultats similaires. A ce propos, et pour augmenter le rendement du glucose, SCZODRAK J et *col* [69,75,76], ont proposé l'utilisation des mutants de *Trichoderma Reesei*, dont l'activité de la β -glucosidase est élevée, ou encore ajouter au système enzymatique utilisé, une autre enzyme d'origine *Aspergillus Niger* qui elle, est riche en activité β -glucosidase.

D'autre part, la représentation en double inverse de LINEWEAR et BURK : $1/v_0=f(1/S_0)$, donne lieu à une cloche. La cinétique d'hydrolyse n'est donc pas Michaelienne. Pour ce qui est des v_0 correspondant à la gamme des S_0 compris entre 10g/l et 67 g/l, cette représentation ($1/v_0=f(1/S_0)$) est linéaire. Le coefficient de corrélation R^2 est de 0,957. Cette cinétique obéit donc à la loi de Michaelis et Menten pour les faibles concentrations de grignons d'olive (figure 37).

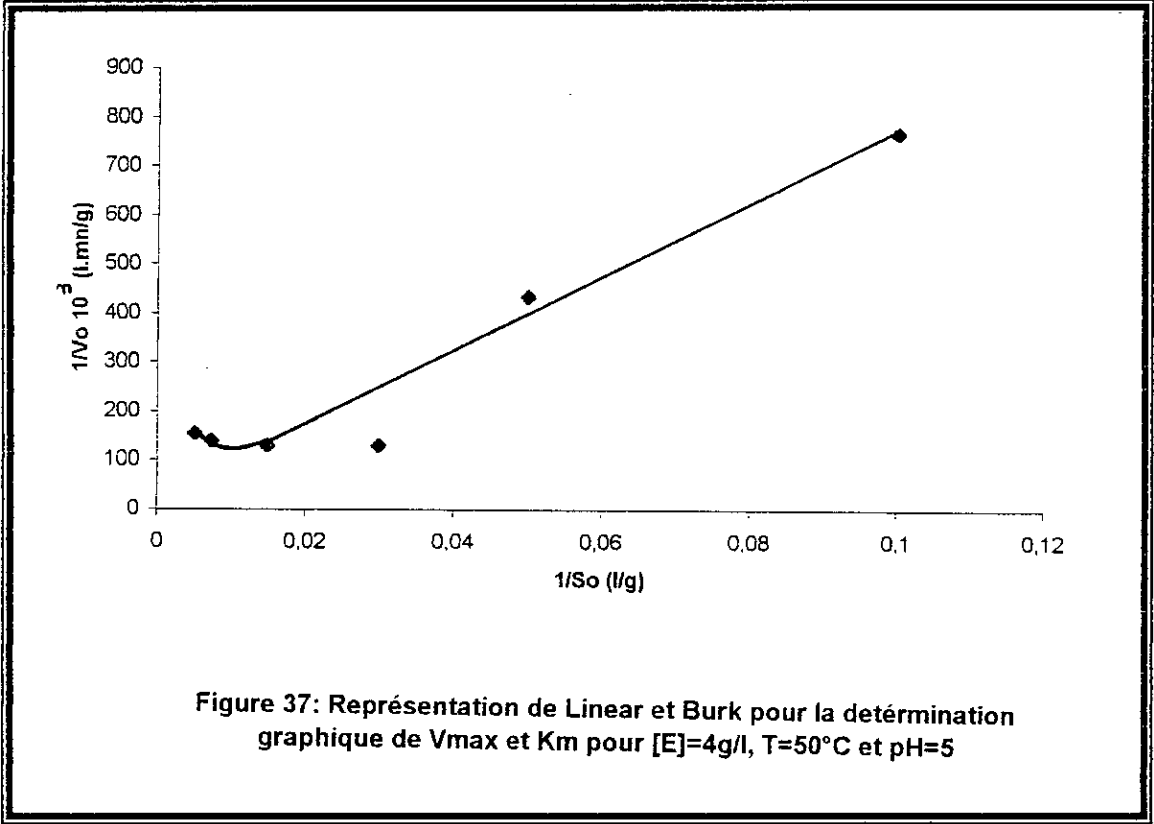


Figure 37: Représentation de Linear et Burk pour la détermination graphique de V_{max} et K_m pour $[E]=4g/l$, $T=50^\circ C$ et $pH=5$

Référence bibliographique	Système enzymatique	Conditions de saccharification				Rendement de saccharification (%)
		Substrat	pH	T°	Durée	
Beltrame P.(1984) [37]	Trichoderma Viride + Aspergillus Niger	Pâte à papier 10 à 14 g/l	4,8	50	24 h	90
Scszodrak J.(1988) [68]	Trichoderma Reesei F.522	Paille de blé 25 g/l	4,5	50	48h	73 (73% glucose)
Thomas H.et col (1982) [70]	Trichoderma Reesei MCG.77	Papier journal 50 g/l	4,8	50	24h	48
Fox D.J.et col (1989) [71]	Trichoderma Reesei C-30	Bagasse 75g/l	4,8	50	48h	56 (31,5% glucose)
Alexander Vet col (1986) [72]	Trichoderma Longibrchitum	Coton 50g/l	4,5	50	48h	74
Douglas B.(1988) [73]	Trichoderma Reesei QM94146	Déchets Solides municipaux	4,8	50	24h	53
Vallander L. (1983) [74]	Trichoderma Reesei	Paille de blé	5,0	50	24h	90

Tableau 10 : Quelques données de la littérature relatives à la saccharification des matériaux Lignocellulosiques en réacteur batch.

Ceci permet de déterminer graphiquement les paramètres cinétiques v_{\max} et K_m du modèle de MICHAELIS et MENTEN simple. Pour rappel, ce modèle de base de l'enzymologie est normalement valable pour une enzyme non allostérique agissant en milieu homogène sur un seul substrat et avec formation d'un seul complexe enzyme-substrat s'écrit :

$$v_0 = v_{\max} S_0 / (S_0 + K_m)$$

Avec :

v_0 : vitesse initiale d'hydrolyse du substrat S (unité recommandée : mole de substrat transformées/ mn/ l) ;

v_{\max} : vitesse maximale d'hydrolyse du substrat S (même unité que v_0) ;

S_0 : concentration initiale en substrat S (mole/l) ;

K_m : l'affinité de l'enzyme pour ce substrat (même unité que S_0).

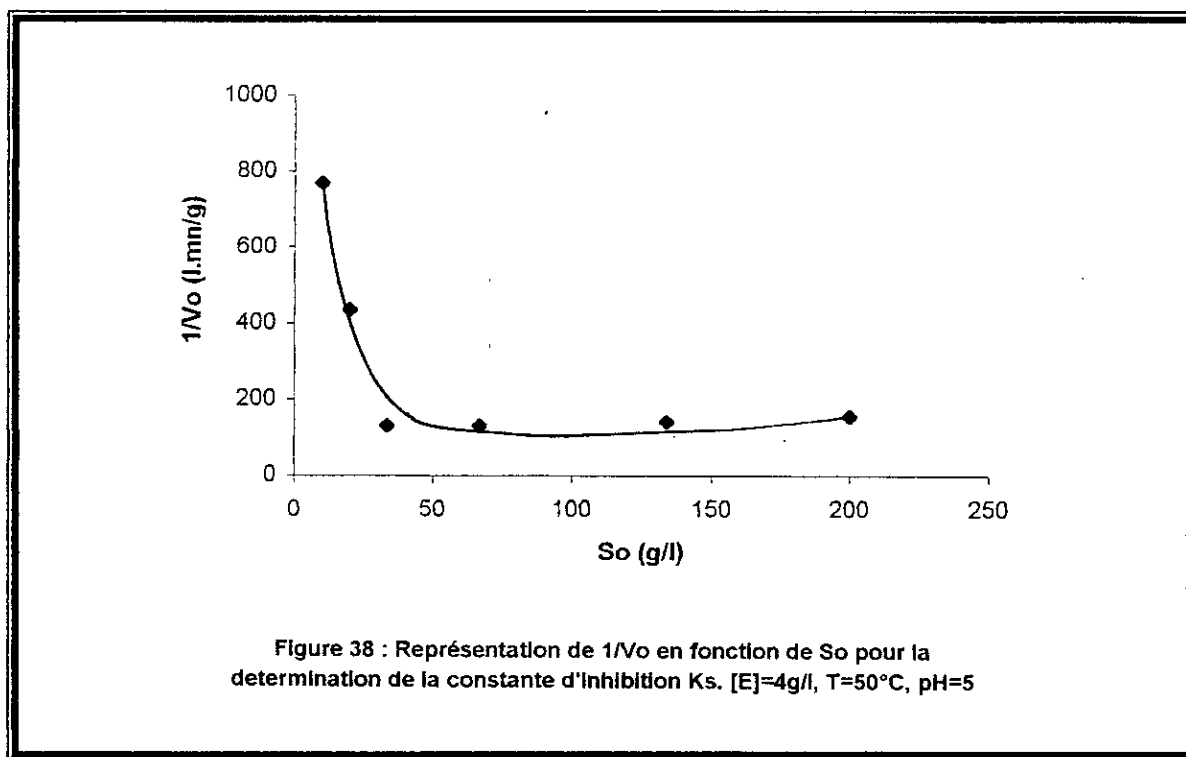
Les valeurs déterminées graphiquement sont :

$$v_{\max} = 0,1 \text{ g/l.mn}$$

$$K_m = 744,46 \text{ g/l}$$

A défaut d'études cinétiques de l'hydrolyse enzymatique des résidus lignocellulosiques et particulièrement des grignons d'olive par la cellulase, les valeurs de K_m et v_{\max} n'ont pas pu être comparées.

La figure 38, donnant l'évolution de l'inverse de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat : $1/v_0 = f(S_0)$, permet de tracer une droite aux fortes concentrations de grignons d'olive, qui coupe l'axe des abscisses à $-1/K_s$, dont K_s est la constante d'inhibition.



La valeur de K_s déterminée graphiquement est :
 $K_s=0,003\text{g/l}$.

Il convient de noter que toutes ces constantes (v_{\max} , K_m et K_s) ne sont qu'apparentes ; elles correspondent à une description simplifiée du comportement de la cellulase. En effet, cette interprétation ne prend pas en compte les éventuelles causes d'inhibition de l'enzyme : inhibition par une substance présente dans le substrat, ou inhibition par des produits d'hydrolyse principalement le cellobiose et le glucose.

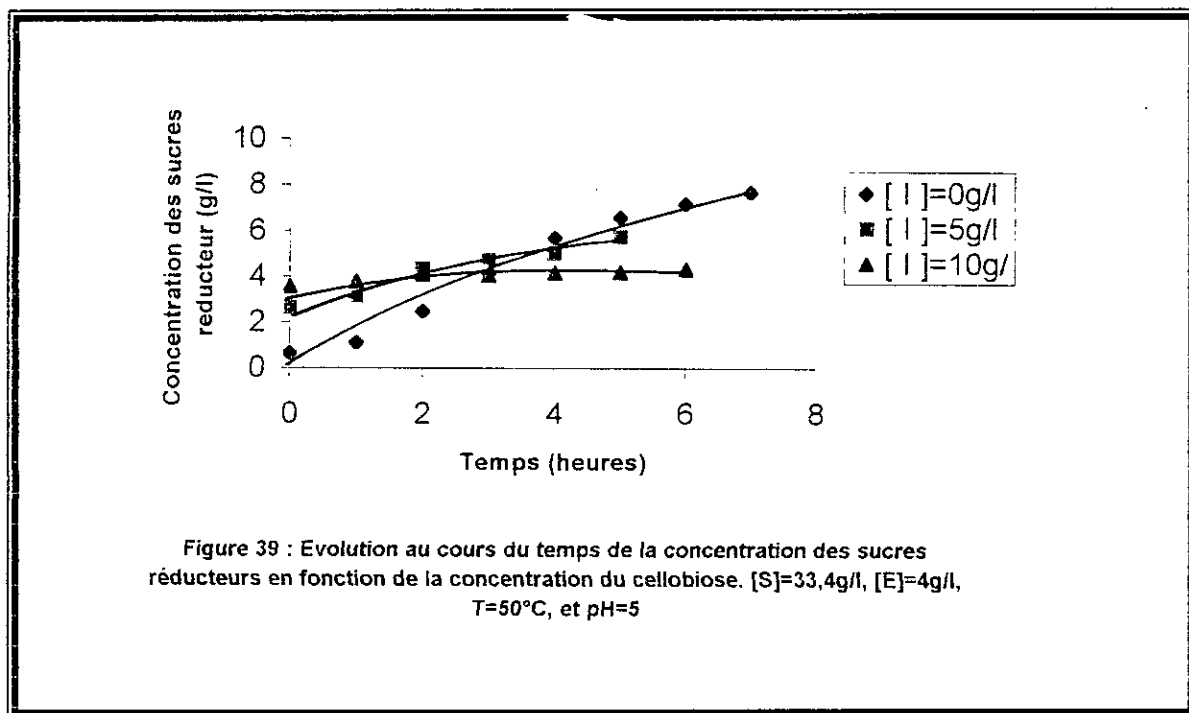
VII-2-5/ Etude de l'effet inhibiteur du cellobiose :

Un grand nombre de substances sont susceptibles, lorsqu'elles sont présentes dans le milieu réactionnel, de moduler l'activité des enzymes : ce sont les effecteurs. Ces modifications de l'activité enzymatique résultent des interactions entre l'effecteur et l'enzyme, ou entre l'effecteur et le substrat.

Les effets peuvent être réversibles (ils cessent en l'absence de l'effecteur) ou irréversibles (ils persistent après cessation des interactions avec l'effecteur).

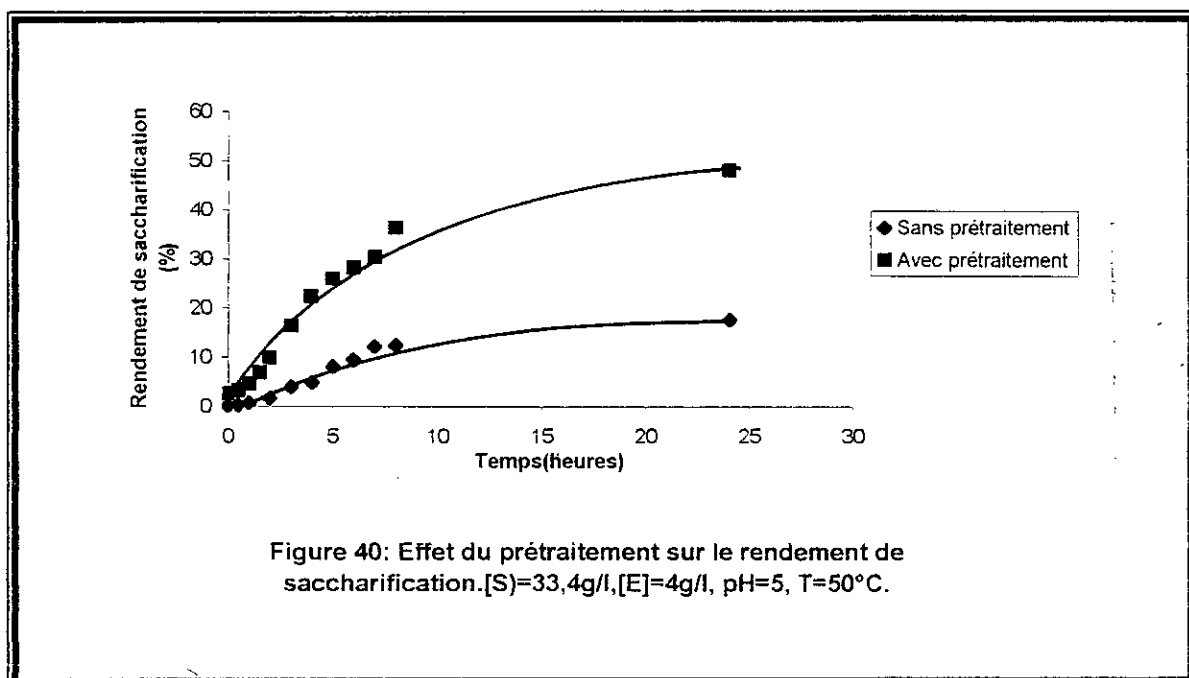
Pour mieux appréhender l'influence des produits d'hydrolyse entre autres le cellobiose (inhibiteur puissant) sur la cinétique de production des sucres réducteurs, nous avons effectué une expérience qui consistait à introduire dans le bioréacteur (conditions opératoires optimales : $[S]=33,4\text{g/l}$, $[E]4\text{g/l}$, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=5$), des quantités croissantes de cellobiose au début de la réaction. La concentration des sucres réducteurs est alors quantifiée au cours du temps.

Les données expérimentales collectées (figure 39), montrent que le cellobiose affecte nettement la production des sucres réducteurs au cours du temps. En effet, après trois heures d'hydrolyse, la concentration des sucres réducteurs dans le milieu réactionnel est inférieure à tout instant à celle obtenue en absence de cellobiose. L'effet inhibiteur est plus remarquable à des concentrations élevées de cellobiose.



IV-2-6/ Effet du prétraitement sur le rendement de saccharification :

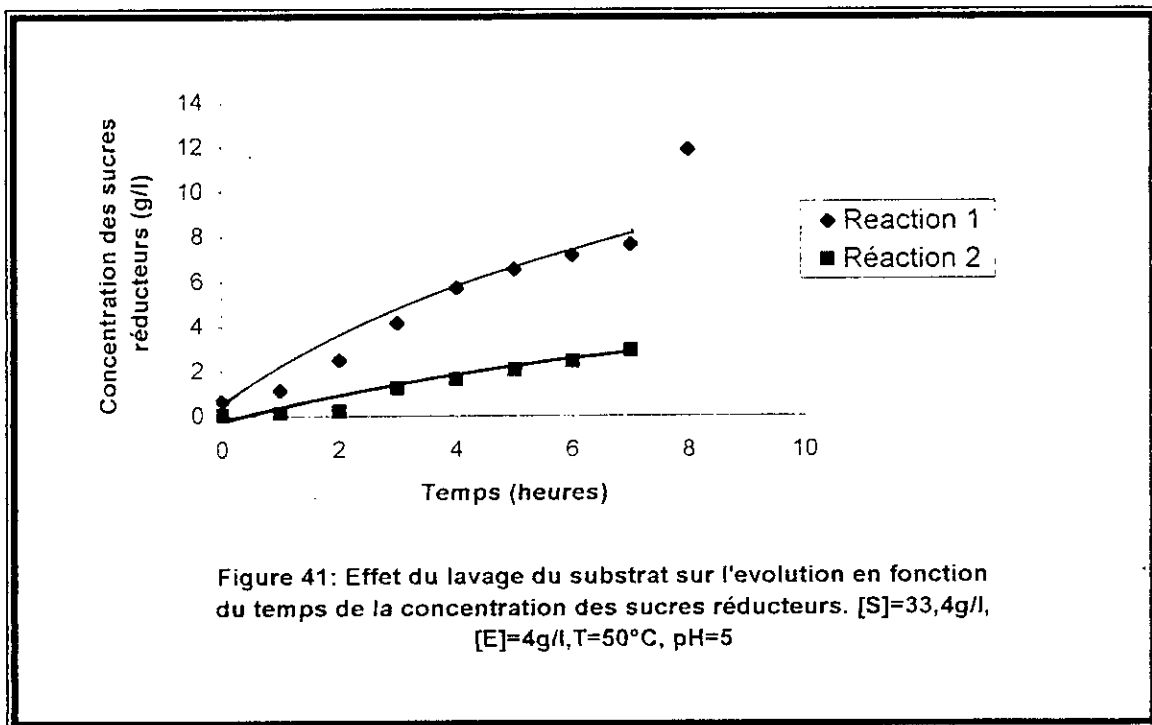
Pour mettre en évidence l'effet du prétraitement à la soude sur le rendement de saccharification des grignons d'olive, nous avons effectué un essai d'hydrolyse enzymatique aux conditions opératoires optimales ([S]=33,4g/l, [E]=4g/l, T=50°C, pH=5) sur un grignon d'olive non traité. Les résultats de cet essai sont comparés à ceux obtenus sans prétraitement (figure 40). Nous constatons que le prétraitement à la soude permet d'améliorer considérablement le rendement de saccharification. Ce denier passe de 19% sans prétraitement à 48% avec prétraitement.



VII-2-7/ Effet du lavage du grignon d'olive hydrolysé sur le rendement de saccharification :

Pour essayer de comprendre le rôle du substrat et sa part dans la diminution de la vitesse d'hydrolyse des grignons d'olive au cours du temps, nous avons effectué un essai d'hydrolyse dans les conditions opératoires optimales (réaction 1). Après 24 heures, on prélève un volume de 250ml, la phase liquide est rejetée, le résidu solide est lavé, séché puis repris par une solution enzymatique fraîche et la réaction d'hydrolyse est alors reinitiée (réaction 2).

Les résultats de cette expérience sont illustrés par la figure 41. Nous constatons qu'il y a un relargage continu des sucres réducteurs dans le milieu réactionnel pour la réaction 2, le rendement atteint après 7 heures d'hydrolyse est de 10% dans ce cas, alors que la réaction 1 atteint un état stationnaire après 24 heures.



Selon DOCHIMA et col [77], ceci est dû probablement au fait qu'après avoir rompu quelques liaisons au cours de la première hydrolyse (réaction 1), l'enzyme est restée sous forme E-S. Cependant une solution enzymatique fraîche serait nécessairement plus active (réaction 2).

Ces mêmes auteurs ont conclu que la réactivité du substrat ne change pas au cours de l'hydrolyse.

DESAI S. J. [78], en étudiant l'évolution de la réactivité du substrat au cours du temps, a conclu que le déclin de la vitesse d'hydrolyse est dû principalement au changement de la capacité adsorptive de l'enzyme et de la réactivité du substrat, et qu'il est nécessaire de considérer la désactivation de l'enzyme comme les produits d'inhibition dans les modèles cinétiques.

Conclusion :

Les essais d'hydrolyse enzymatique des grignons d'olive en mode batch nous ont permis de constater que ce processus est influencé par divers paramètres.

En effet, le rendement de saccharification global et le rendement de glucose atteignent leurs valeurs maximales à une concentration d'enzyme de 4g/l et une concentration de grignons d'olive de 33,4g/l à pH=5 et T=50°C.

La cinétique d'hydrolyse enzymatique suit le modèle de Michaelis-Menten aux faibles concentrations de substrat. Les valeurs des constantes cinétiques sont 744,46 g/l pour K_m et 0,1g/l.mn pour v_{max} . Les fortes concentrations inhibent la réaction enzymatique et la constante d'inhibition K_s est de 0,003g/l.

De même le cellobiose est un inhibiteur de ce processus à partir d'une concentration de 5 g/l ; l'inhibition est plus forte à 10 g/l.

Le traitement des grignons d'olive à la soude améliore considérablement le rendement de saccharification. Ce dernier passe de 19% sans prétraitement à 48% avec prétraitement.

Chapitre VIII

Etude de l'hydrolyse enzymatique dans un réacteur continu couplé à un ultrafiltre

INTRODUCTION.....	77
VIII-1/ ETUDES ANTÉRIEURES :	77
VIII-2/ MATÉRIELS ET MÉTHODES:	78
VIII-2-1/ MATÉRIELS :	78
<i>A/ Principe de fonctionnement du module d'ultrafiltration:</i>	79
<i>B/ Mise en service du module d'ultrafiltration:</i>	79
<i>C/ RÉGÉNÉRATION DES MEMBRANES :</i>	79
VIII-2-2/ MÉTHODES:	80
- <i>Détermination de l'état de référence de la membrane :</i>	80
VIII-3/ RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS :	80
VIII-3-1/ DÉTERMINATION DE L'ÉTAT DE RÉFÉRENCE DE LA MEMBRANE :	80
VIII-3-2/ ETUDE DE LA RÉTENTION DE L'ENZYME :	81
VIII-3-3/ DÉTERMINATION DES COURBES DE POLARISATION :	82
VIII-3-4/ ETUDE DE L'EFFET DE LA VITESSE DE RECIRCULATION ET DE LA PRESSION TRANSMEMBRANAIRE SUR LES PERFORMANCES DU RÉACTEUR CONTINU :	83
<i>A/ Effet de la vitesse de recirculation sur les performances du bioréacteur continu :</i>	83
<i>B/ Effet de la pression transmembranaire sur les performances du bioréacteur continu:</i>	88
VIII-3-5/ Etude de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique des grignons d'olive dans un réacteur continu couplé à l'ultrafiltration :	91
VIII-3-6/ Evolution de la concentration des sucres à concentration maximale de substrat ($S_0 = 70g/l$) :	95
VIII-3-7/ Etude du bilan de matière dans le réacteur continu à membrane :	96
CONCLUSION :.....	98

Etude de l'hydrolyse enzymatique dans un réacteur continu couplé à un ultrafiltre

Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'hydrolyse enzymatique des grignons d'olive dans un réacteur continu couplé à l'ultrafiltration. L'application de l'ultrafiltration pour la séparation entre le mélange enzyme-substrat et les produits de réaction semble être une alternative sans équivoque pour la lutte contre les phénomènes d'inhibition.

Dans cette étude, il importe que la membrane utilisée soit imperméable à l'enzyme, la rétention de celle-ci nécessite donc un seuil de coupure relativement bas, ce qui pose une limite aux débits de perméat.

Dans notre étude, une membrane a été testée : CARBOSEP M5, désignée par son seuil de coupure de 10 kDa.

VIII-1/ Etudes antérieures :

- HENLEY R.J. et *col* [79], ont étudié l'aptitude de certains résidus lignocellulosiques à la saccharification enzymatique par une cellulase d'origine *Trichoderma Viride*, et l'efficacité de son couplage à un ultrafiltre dans l'élimination de l'effet inhibiteur de certains produits d'hydrolyse. L'ensemble de leurs expériences ont été en faveur de l'utilisation d'une membrane de seuil de coupure de 50 kDa, qui permet d'une part, le passage de tous les produits d'hydrolyse, et d'autre part, retient la cellulase et le substrat.
- ALFANI F. et *col* [80], ont proposé l'étude de la saccharification des résidus agricoles en utilisant deux réacteurs séparément. Le premier est un réacteur à membrane où la cellulose prétraitée est convertie en cellobiose, ce dernier est converti en glucose par une β -glucosidase dans un second réacteur. Selon ces auteurs, cette conception permet la transformation complète de la cellulose en glucose.

VIII-2/ Matériels et méthodes:

VIII-2-1/ Matériels :

Le bioréacteur à membrane utilisé comporte :

- Un bioréacteur d'un litre, où s'effectue la réaction d'hydrolyse ;
- Un module d'ultrafiltration équipé d'une membrane minérale de type tubulaire d'une surface d'échange de 120 cm² et de seuil de coupure de 10 kDa ;
- Une pompe péristaltique modèle 30 PPV/220V, alimente le réacteur en substrat ;
- Une deuxième pompe modèle Watson Marlow 603S/12 recircule l'hydrolysât dans le module d'ultrafiltration. Le retentat composé de l'enzyme, du substrat non hydrolysé et des polysaccharides de masses moléculaires élevées est réinjecté dans le bioréacteur, et le perméat composé des sucres simples est recueilli à la sortie supérieure du module membranaire (figure 42).

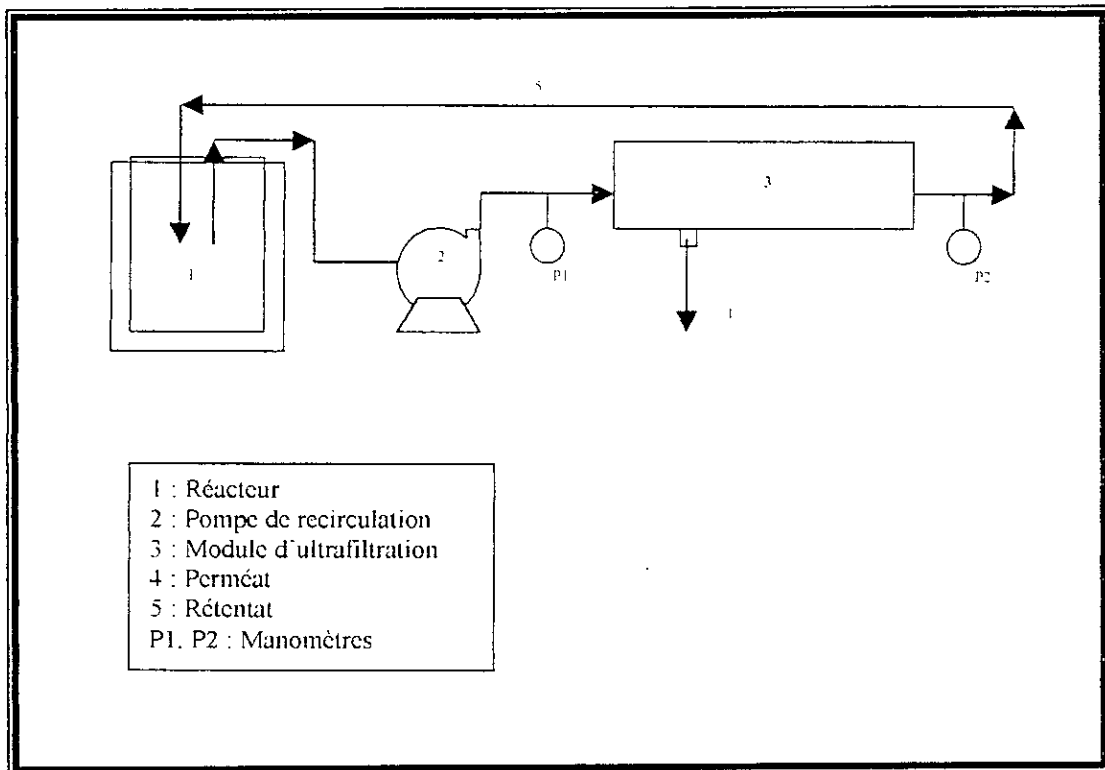


Figure 42 : Réacteur continu couplé à un ultrafiltre.

A/ Principe de fonctionnement du module d'ultrafiltration :

Le mélange à traiter est introduit dans le bac d'alimentation, entraîné par la pompe de recirculation, il passe dans la membrane d'ultrafiltration.

- Le rétentat est réinjecté dans la boucle de filtration via le bac d'alimentation.
- Le perméat est recueilli à la sortie supérieure du module membranaire
- La pression à l'intérieur de la membrane est amenée à la pression voulue en réglant le degré d'ouverture de la vanne de sortie rétentat. La pression à l'entrée et à la sortie du module membranaire est mesurée par un capteur de pression (un manomètre) et la moyenne de ces deux pressions correspond à la pression transmembranaire mise en œuvre.

Pour fonctionner en continu, le volume de perméat évacué est régulièrement compensé par l'introduction, dans le bac d'alimentation, d'un même volume de solution (tampon acétate + grignons d'olive prétraités).

B/ Mise en service du module d'ultrafiltration :

Chaque essai débute par la mesure du débit à l'eau déminéralisée donné par la membrane, d'abord dans les conditions standards pour s'assurer de sa propreté, ensuite dans les conditions de l'expérience à réaliser afin d'évaluer l'intensité du colmatage de la membrane.

Le débit de recirculation est réglé grâce à l'ajustement de l'ouverture de la vanne d'entrée du module membranaire ou de la vitesse de la pompe de recirculation.

Le module est ainsi mis en service avec la solution à traiter pendant 5 minutes, pour stabiliser la couche de polarisation de la membrane.

La vanne supérieure de sortie perméat est alors ouverte lentement, et la vanne de sortie rétentat est progressivement fermée jusqu'à obtention de la pression transmembranaire voulue.

En fin d'expérience, l'installation est arrêtée et vidangée.

C/ Régénération des membranes :

Le lavage de la membrane comporte les étapes suivantes :

- 1- Vidange de l'installation ;
- 2- Rinçage à l'eau déminéralisée ;

- 3- Rinçage basique à 80°C en faisant circuler dans le module membranaire une solution de soude décimolaire pendant 30 minutes ;
- 4- Rinçage à l'eau déminéralisée, et mesure du débit à l'eau ; ce dernier doit être au moins égal à 95% de celui du départ ;
- 5- Renouveaulement de l'étape 3 et 4 jusqu'à clarification de la solution de lavage ;
- 6- Rinçage de l'installation et vérification du débit à l'eau déminéralisée.

VIII-2-2/ Méthodes :

A/ Détermination de l'état de référence de la membrane :

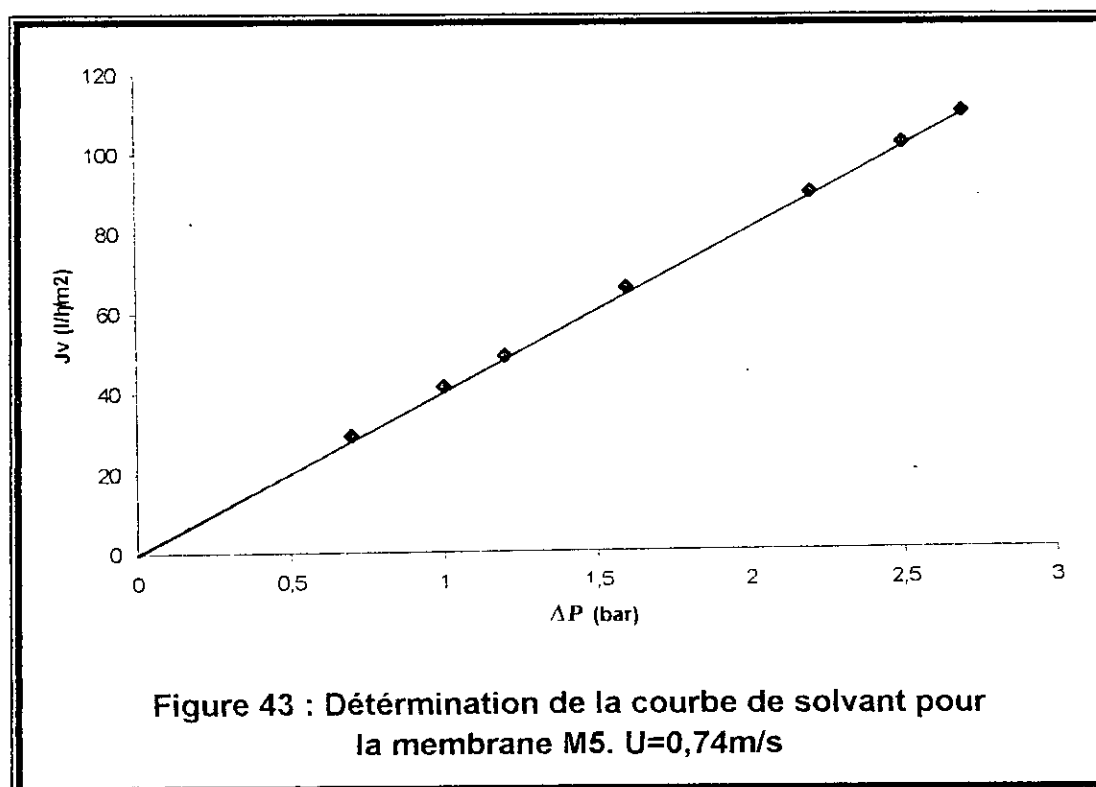
L'état de référence de la membrane se caractérise par le flux du solvant dont l'évolution en fonction de la pression transmembranaire doit être linéaire conformément à la loi de DARCY.

Après remplissage du bac d'alimentation, on fait recirculer l'eau pendant quelques minutes. on fixe la vitesse de recirculation et on augmente progressivement la pression transmembranaire et pour chaque valeur de celle-ci on mesure le flux du perméat par la technique de l'empotage.

VIII-3/ Résultats et interprétations :

VIII-3-1/ Détermination de l'état de référence de la membrane :

La figure 43 représente l'évolution du flux du perméat J_v en fonction de la pression transmembranaire ΔP appliquée. Nous remarquons que cette évolution est linéaire, dont la pente (Lp_0) définit la perméabilité de la membrane.



La valeur de la perméabilité déterminée graphiquement est $L_{p0}=40 \text{ l/h/m}^2/\text{bar}$.

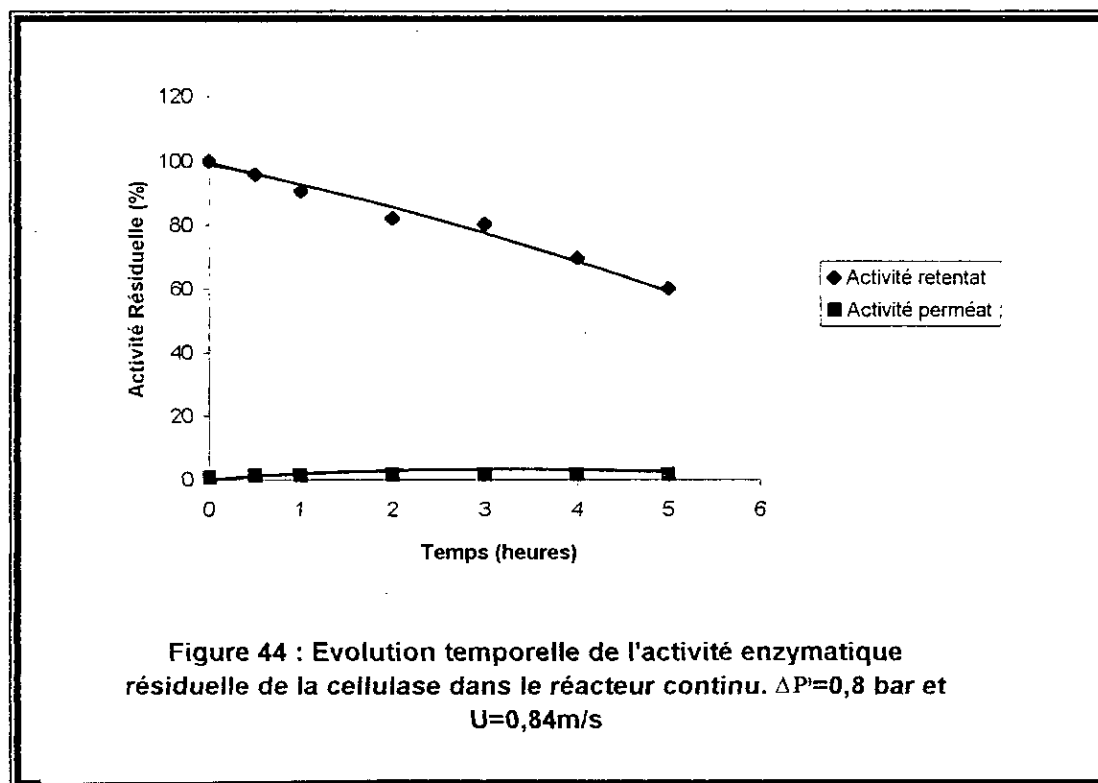
VIII-3-2/ Etude de la rétention de l'enzyme :

L'expérience consistait à faire circuler une solution enzymatique (4g/l) dans le réacteur en recyclant le perméat et le retentat. L'activité résiduelle dans le retentat et dans le perméat est mesurée à différents temps de l'essai.

La figure 44 illustre ces évolutions. Nous constatons qu'après 5 heures de fonctionnement, l'activité résiduelle dans le retentat diminue et atteint 65 % de l'activité initiale. La perte d'activité observée est vraisemblablement à mettre au compte de tout cet ensemble de phénomènes habituels en ultrafiltration et qui regroupe :

- La polarisation de concentration ;
- Le piégeage du catalyseur dans les pores du matériau filtrant ;
- L'Adsorption du catalyseur sur le même matériau ;
- L'inactivation du catalyseur par les contraintes mécaniques imposées dans le réacteur ; celle-ci peut être amplifiée par l'effet thermique.

Par ailleurs, l'activité enzymatique détectée dans le perméat est pratiquement négligeable et est constante pendant toute la durée de l'expérience. Elle atteint 1,5 % de sa valeur initiale après 5 heures de fonctionnement.



Ces résultats montrent que la membrane M5 est pratiquement imperméable à l'enzyme utilisée.

De plus, la détermination de la perméabilité de la membrane avant et après l'essai de rétention, montre que cette dernière a chuté de 68%. Ceci nous permet de conclure qu'il y a une forte interaction entre la membrane et la solution à traiter.

Rappelons que la rétention d'un soluté par une membrane dépend non seulement de la masse moléculaire mais d'autres caractéristiques de ce soluté telles que : la charge, la conformation et la concentration.

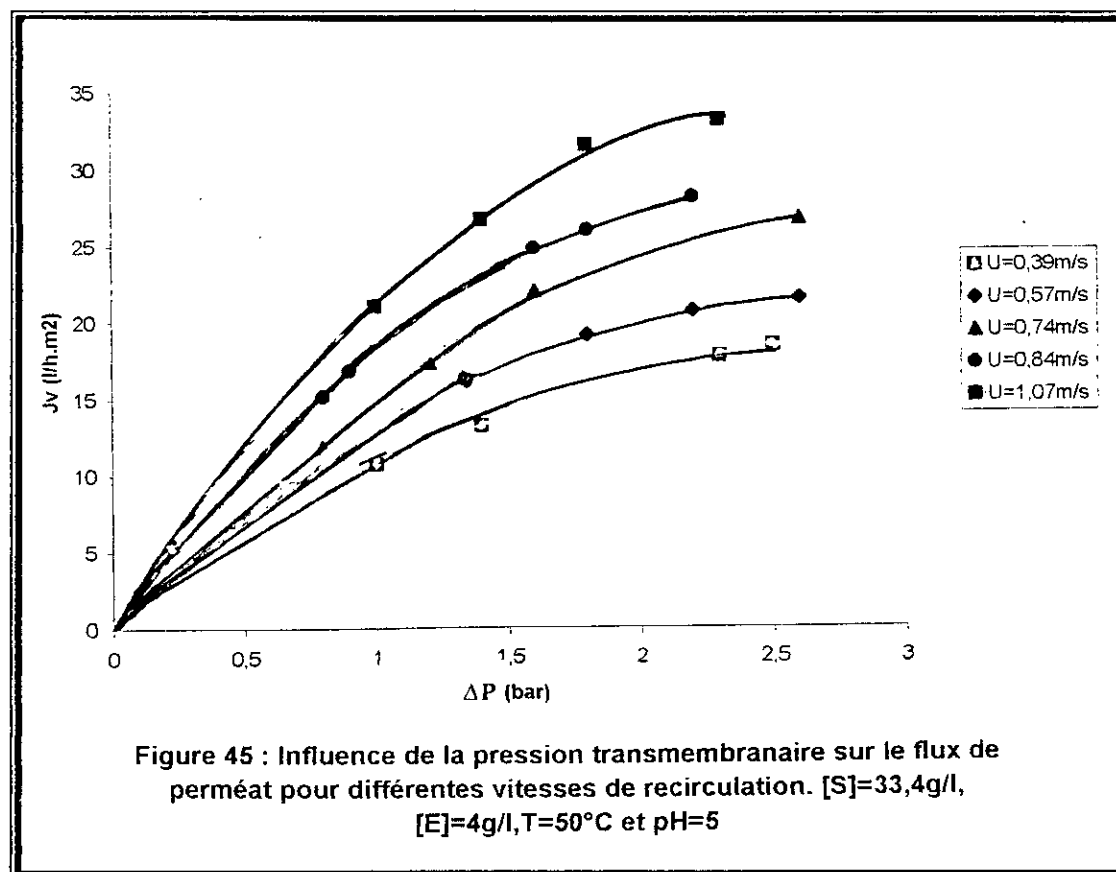
Il est à noter que la perméabilité initiale a été déterminée après plusieurs essais de régénération jusqu'à obtention d'une valeur constante.

VIII-3-3/ Détermination des courbes de polarisation :

Un hydrolysât de grignons d'olive à concentration initiale de 33,4 g/l est préparé en réacteur discontinu avec une concentration d'enzyme de 4g/l, à pH=5 et à température T=50°C pendant 6 heures.

Cet hydrolysât est ultrafiltré à différentes vitesses de recirculation et pressions transmembranaires.

Les courbes obtenues (figure 45) ont une allure conforme aux courbes de polarisation de concentration d'ultrafiltration données par la littérature .



En effet, pour les pressions ($\Delta P < 1,5 \text{ bar}$), le flux d'ultrafiltration croît linéairement pour l'ensemble des vitesses de recirculation testées. au delà de $\Delta P = 1,5 \text{ bar}$, le flux tend à atteindre un palier et devient alors indépendant de la pression, mais influencé par la vitesse de recirculation.

Tous ces paliers indiquent la formation d'une couche de polarisation de concentration au niveau de la membrane. l'épaisseur de celle-ci dépend de la valeur de la vitesse de recirculation.

Cette évolution est identique aux autres évolutions observées dans le cas des solutions de sang d'abattoir et des solutions d'huilerie [47,81].

VIII-3-4/ Etude de l'effet de la vitesse de recirculation et de la pression transmembranaire sur les performances du réacteur continu :

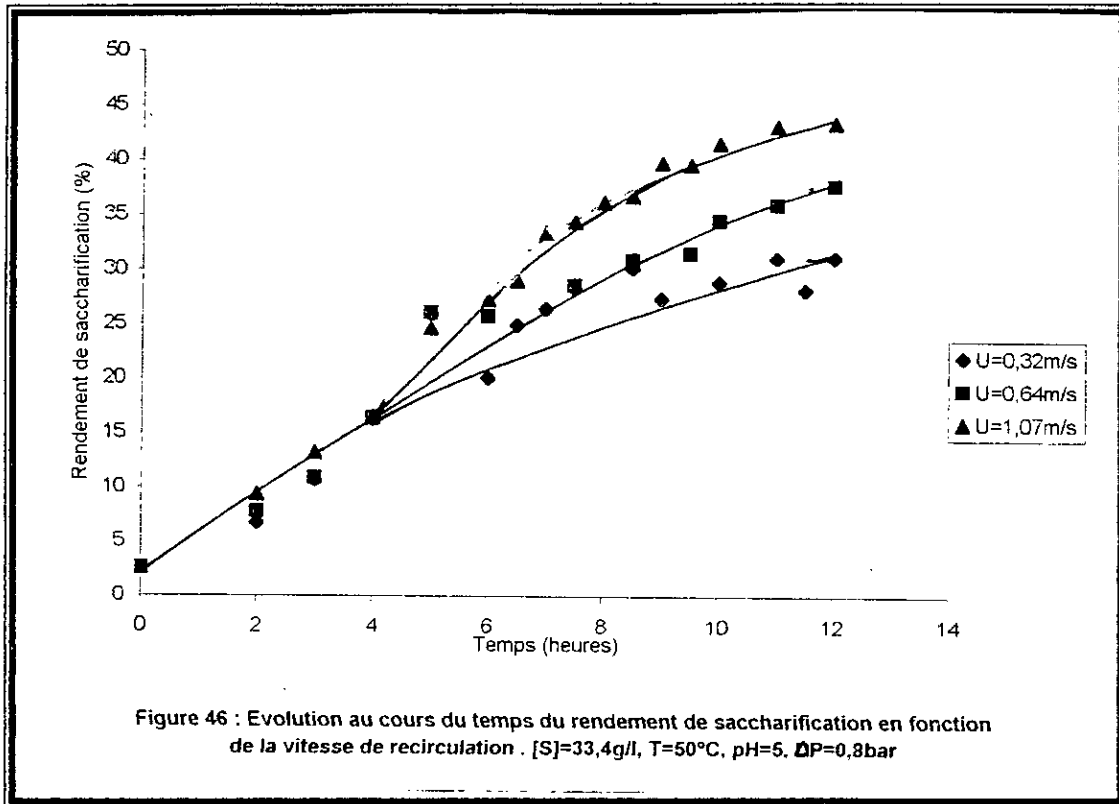
A/ Effet de la vitesse de recirculation sur les performances du bioréacteur :

Avant l'ultrafiltration, l'hydrolyse se déroule d'abord en batch pendant 6 heures en dehors du réacteur d'ultrafiltration. L'hydrolysât obtenu est ensuite chargé dans ce réacteur (réacteur à membrane), et y circule 30 minutes avec recyclage du perméat et pendant que la pression transmembranaire est progressivement augmentée jusqu'à la valeur désirée. ce n'est qu'une fois cette valeur de ΔP atteinte, que le fonctionnement en mode continu (sans recyclage du perméat) commence.

(conditions opératoires pour le batch sont : Concentration des grignons d'olive de $33,4 \text{ g/l}$, concentration d'enzyme = 4 g/l , température 50°C , $\text{pH} = 5$, durée d'hydrolyse = 5 heures, volume réactionnel = 400 ml)

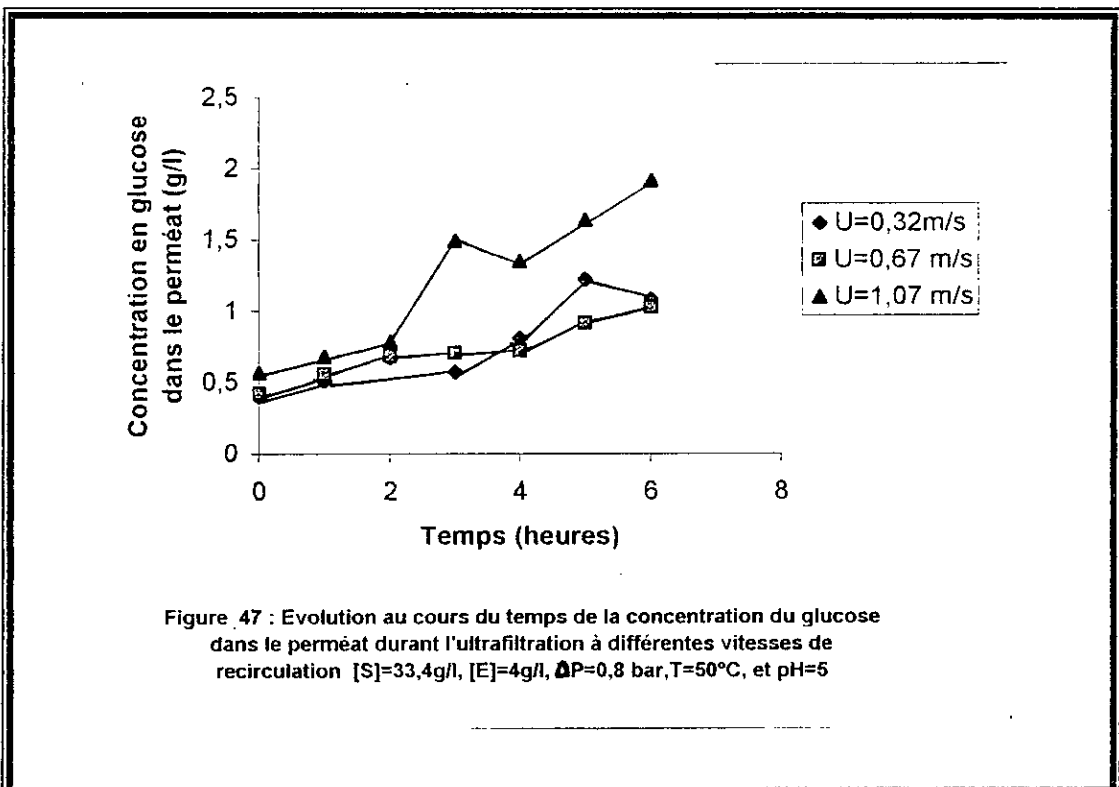
Durant cette étape, 3 vitesses ont été testées : $U = 0,32 \text{ m/s}$, $U = 0,67 \text{ m/s}$ et $U = 1,07 \text{ m/s}$, pour une pression transmembranaire constante : $\Delta P = 0,8 \text{ bar}$.

Les résultats de cette expérience sont représentés sur la figure 46 :



Au delà de la phase transitoire initiale (phase discontinue), il semble qu'il se produise une augmentation continue de la concentration en produits d'hydrolyse (figure 46). Le rendement de saccharification le plus élevé est de 44% ; il est obtenu pour la vitesse de recirculation la plus élevée (U=1,07m/s).

De même, le plus haut rendement du glucose est obtenu à la vitesse de recirculation la plus élevée (figure 47).



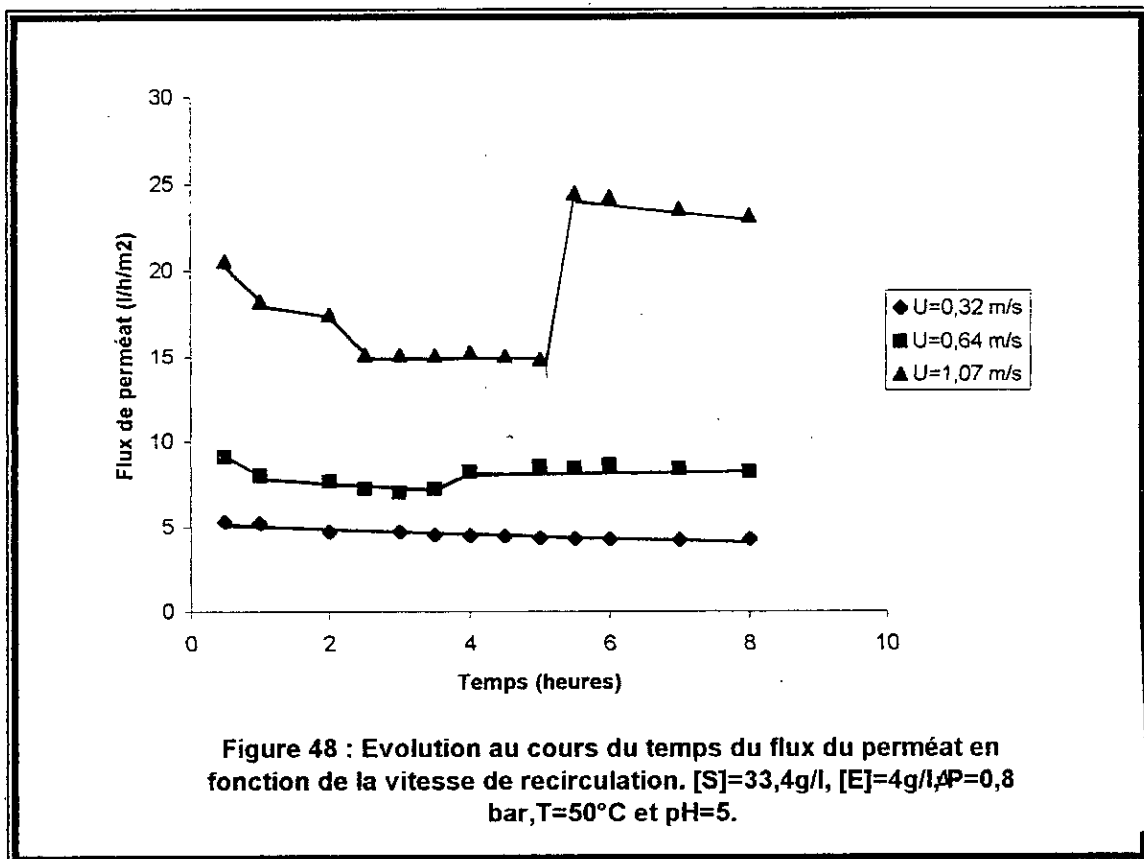
Nous pouvons conclure que l'élévation de la vitesse de recirculation à 1,07 m/s améliore considérablement les rendements d'hydrolyse.

Les résultats de la détermination de la perméabilité avant et après l'essai d'ultrafiltration à différentes vitesses de recirculation sont représentés sur le tableau 11 : **Tableau 11 : Influence de la vitesse de recirculation sur le coefficient d'abattement de la perméabilité.**

Vitesse (m/s)	0,32	0,64	1,07
Chute de la perméabilité (%)	69,03	63,15	60,18

L'analyse de ces pourcentages montre que ces derniers sont élevés, confirmant la forte interaction entre la membrane et la solution à traiter. La chute de la perméabilité n'est pas influencée par la vitesse de recirculation.

Par ailleurs, l'évolution du flux de perméat au cours du temps pour différentes vitesses de recirculation testées (figure 48), nous a permis de constater :



- Qu'à faible vitesse de recirculation ($U = 0,32$ m/s), aucune évolution du flux de perméat n'a été observée. Le flux est faible et constant durant tout l'essai. Les faibles vitesses de recirculation accélèrent le colmatage de la membrane.
- A la vitesse $U = 0,67$ m/s, le flux diminue légèrement et atteint un palier après 1 heure de fonctionnement.
- A une vitesse de recirculation plus grande : $U = 1,07$ m/s, le flux de perméat diminue au début et atteint un palier au bout de 2 heures, ensuite il recroît pour atteindre à nouveau un second palier. Cette vitesse permet vraisemblablement d'améliorer le flux de perméat.

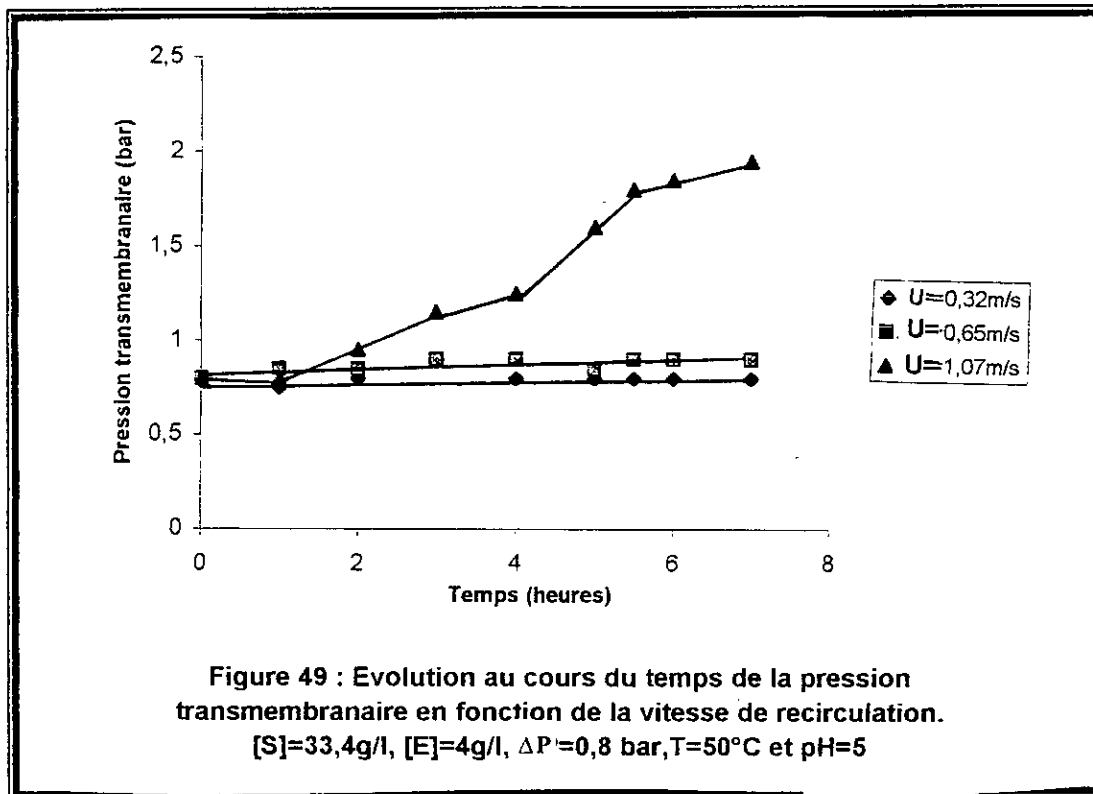
Le rehaussement du flux du perméat, peut être expliqué par la destruction et le raclage de la couche de polarisation formée au niveau de la membrane.

Il est important de noter que la destruction de la couche dynamique a été étudiée par certains auteurs tels que NGUEN et NEEL cités par [82], qui ont observé que pour des solutions de polymères synthétiques, la contrainte de cisaillement due à l'écoulement de la solution au niveau des pores, provoque la déformation des macromolécules, d'autres CANEL ET RONDELEZ, GUILLOT et *col* cités par [44], ont attribué cette destruction à l'augmentation de la concentration au delà d'une certaine limite rendant possible le passage des molécules.

Toutefois tous ces auteurs ont travaillé avec des solutions synthétiques, alors que dans notre cas, nous avons travaillé avec une solution complexe ou la détermination des causes exactes de cette destruction n'est pas évidente.

Néanmoins, notre solution étant hétérogène (elle est formée de deux phases : une phase solide et une phase liquide), nous supposons que la destruction de la couche de polarisation est due au raclage de celle ci par les particules solides ; phénomène déjà observé par BALMANE [82].

L'effet de la vitesse de recirculation sur l'évolution en fonction du temps de la pression transmembranaire au cours de ces essais est illustré par la figure 49 :



Nous remarquons, que l'élévation de la vitesse de recirculation influe fortement sur la pression transmembranaire, celle-ci augmente au cours du temps jusqu'à atteindre presque 2 bar après 5 heures de fonctionnement à $U = 1,07 \text{ m/s}$.

Un autre paramètre donnant plus d'information sur l'activité du bioréacteur continu à membrane a été étudié, il s'agit de la productivité instantanée du bioréacteur. Ce paramètre défini par CHERYAN M. et MANIHEIM A. [83] représente la quantité de produit obtenue par unité de masse d'enzyme et par unité de volume du réacteur :

$$P_i = C_p J_v t / EV$$

où P_i : Productivité instantanée en réacteur continu (g/g);

C_p : Concentration en produits dans le perméat (g/l);

J_v : flux du perméat (l/h);

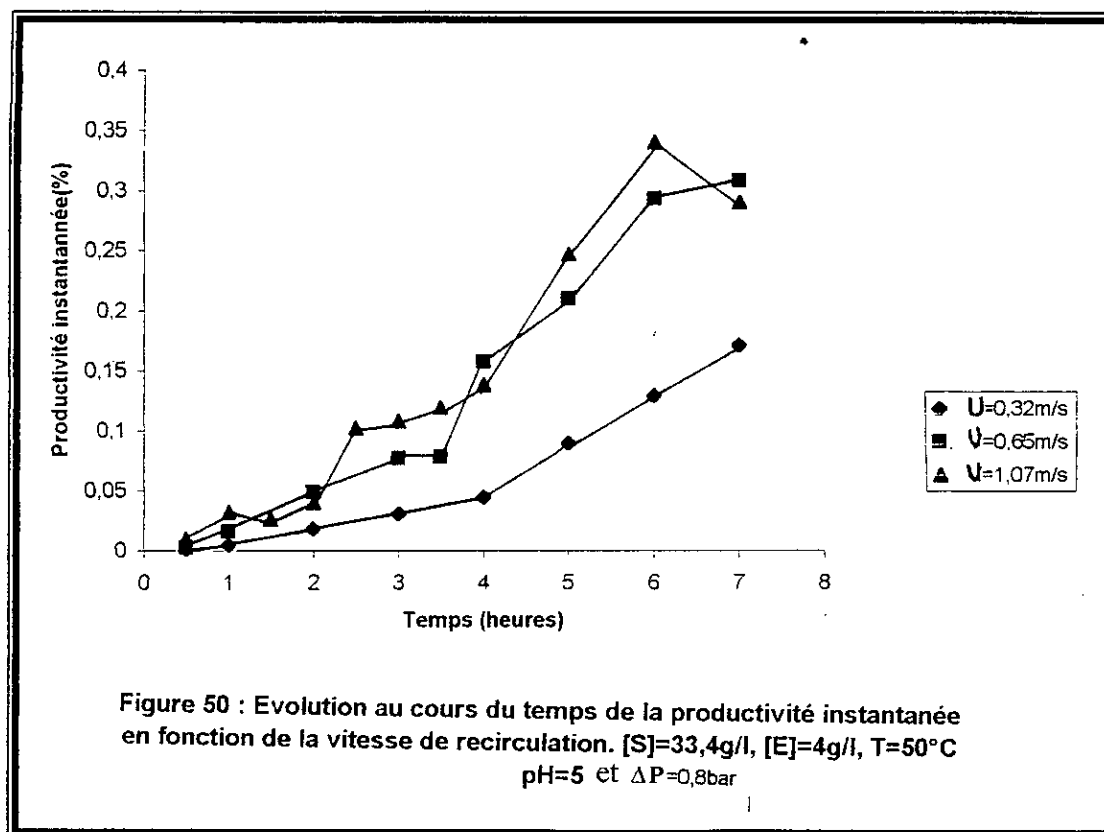
t : Temps en heures (h);

E : Concentration en enzyme (g);

V : volume du réacteur (l).

La représentation de l'évolution de la productivité instantanée en fonction du temps pour différentes vitesses de recirculation, montre que celle-ci augmente au cours du

temps pour toutes les vitesses testées, mais ne semble pas être très altérée par l'élévation de la vitesse de recirculation (figure 50).



Globalement, la vitesse de recirculation $U=1,07\text{ m/s}$, semble donner les meilleurs résultats en débit de perméat, rendement d'hydrolyse, et en productivité du bioréacteur.

Pour la suite de notre étude, nous avons travaillé à $U = 1,07\text{ m/s}$.

B/ Effet de la pression transmembranaire sur les performances du bioréacteur:

Une nouvelle expérience a été réalisée, pour laquelle le réacteur a été rempli au départ avec un hydrolysât de grignons d'olive à un stade déjà avancé de conversion (préparé en batch pendant 5 heures).

Durant l'étape d'ultrafiltration, nous avons procédé à un nouvel essai à une pression transmembranaire plus élevée $\Delta P= 1,3\text{ bar}$ et à vitesse constante $U=1,07\text{ m/s}$.

La figure 51 illustre l'effet de la pression transmembranaire sur l'évolution en fonction du temps du flux du peméat. Nous remarquons que, pendant toute la durée d'ultrafiltration (6 heures), la densité du flux à 1,3 bar est à tout instant supérieure à celle mesurée à 0,8 bar.

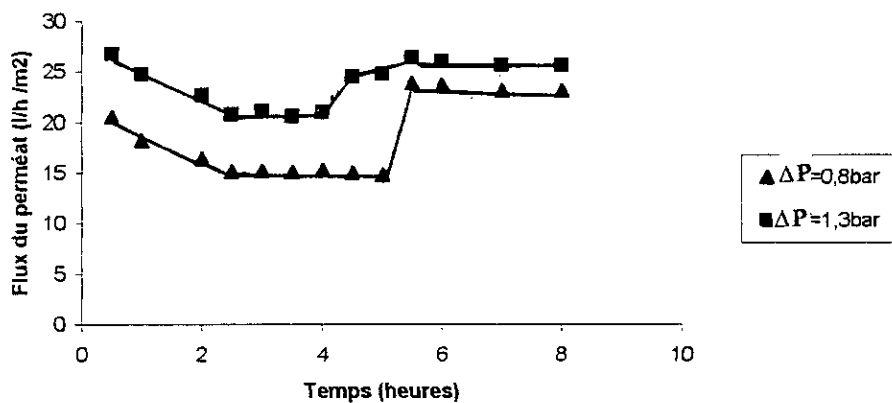


Figure 51 : Evolution au cours du temps du flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire. $U=1,07 \text{ m/s}$, $[S]=33,4 \text{ g/l}$, $[E]=4 \text{ g/l}$, $\text{pH}=5$ et $T=50^\circ\text{C}$

L'augmentation de la pression transmembranaire à 1,3 bar apparaît comme une solution satisfaisante pour améliorer le débit du perméat.

En revanche, le rendement global de l'hydrolyse n'est pas altéré par l'augmentation de la pression transmembranaire. La pression de 1,3 bar permet d'obtenir un rendement de saccharification de 47% contre 44% à 0,8 bar (figure 52).

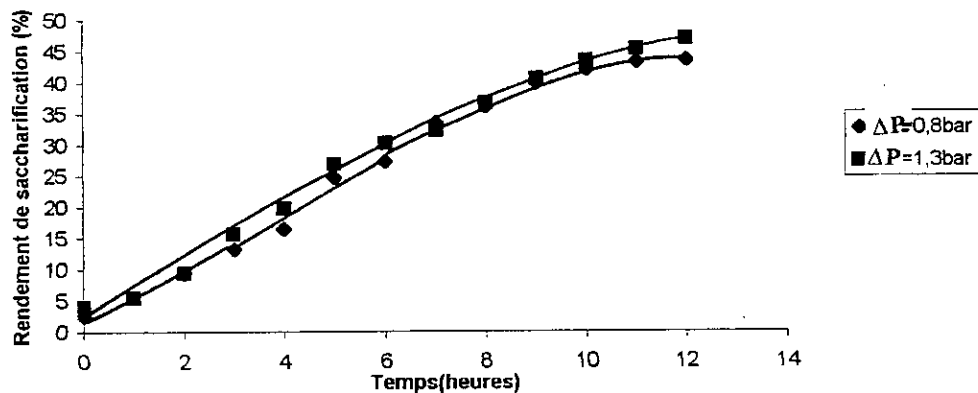
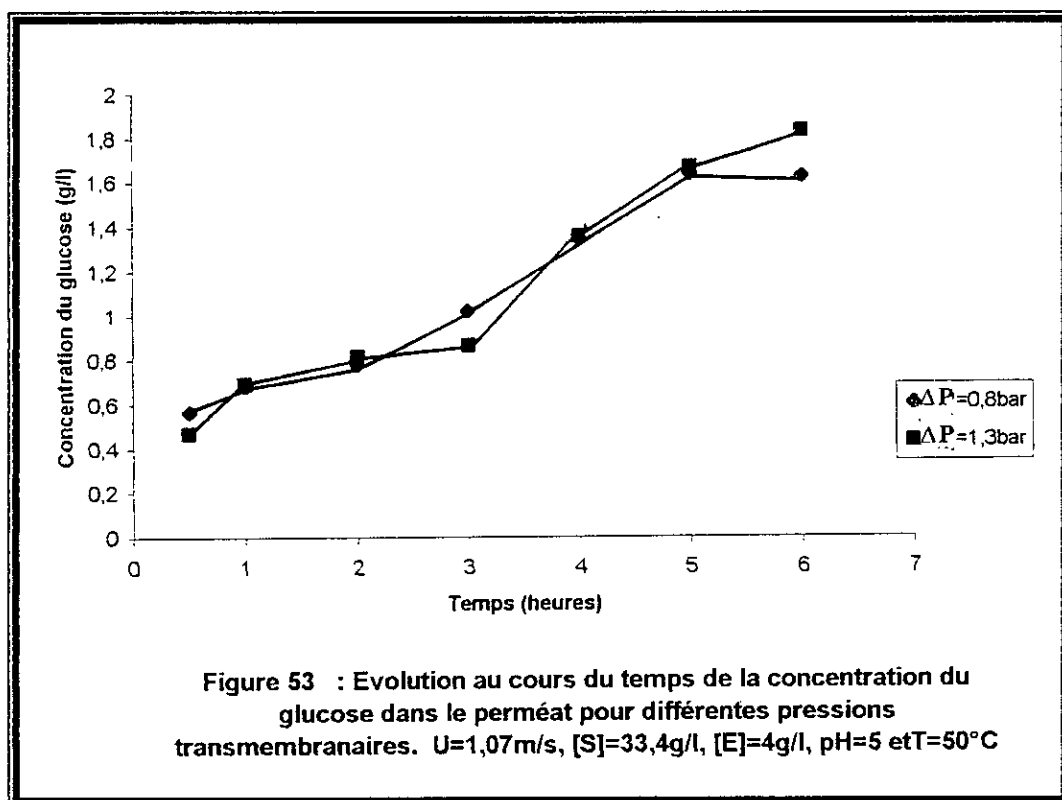
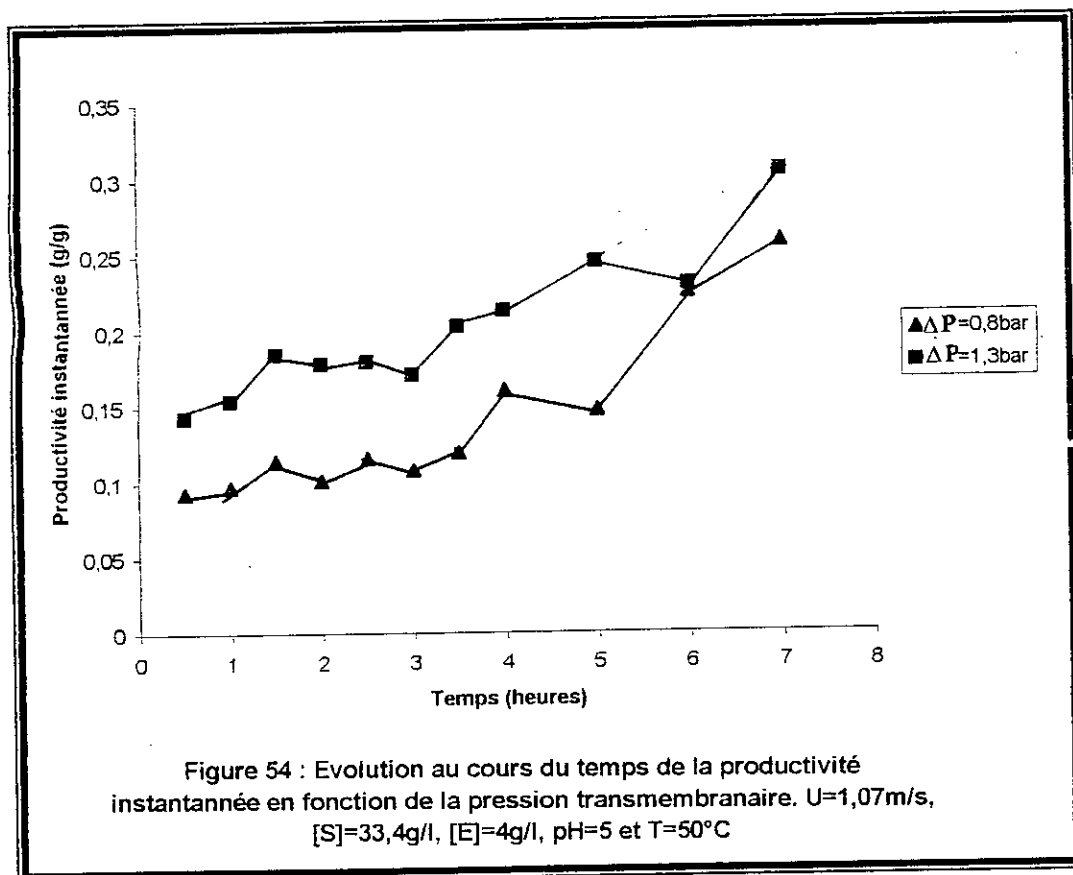


Figure 52 : Evolution du rendement de saccharification en fonction de la pression transmembranaire. $[S]=33,4 \text{ g/l}$, $[E]=4 \text{ g/l}$, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=5$, $U=1,07 \text{ m/s}$.

Quant à l'évolution de la concentration du glucose dans le perméat (figure 53), il semble qu'il se produise une augmentation faible mais continue de la concentration glucose dans le perméat à 0,8 bar comme à 1,3 bar. La composition du perméat en glucose est pratiquement la même dans les deux cas.



De même pour l'évolution de la productivité instantanée au cours du temps (figure 54), nous remarquons qu'il y'a augmentation continue des produits d'hydrolyse et par conséquent augmentation de la productivité instantanée du bioréacteur à membrane pour les deux pressions. L'évolution de la productivité instantanée est plus accentuée pour la pression la plus élevée.



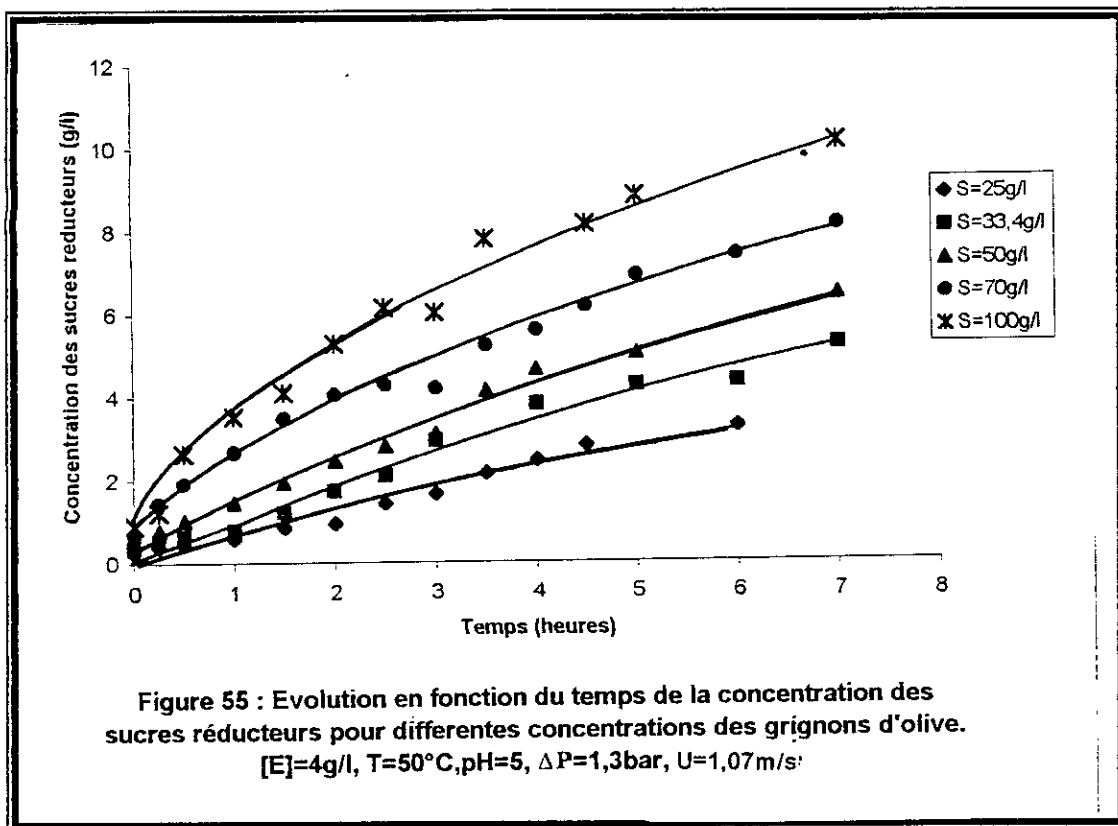
En définitive, l'élévation de la pression transmembranaire affecte plus la productivité du bioréacteur continu à membrane que le flux du perméat et le rendement de saccharification.

VIII-3-5/ Etude de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique dans un réacteur continu couplé à l'ultrafiltration :

Pour l'étude de la cinétique enzymatique des grignons d'olive en réacteur continu couplé à l'ultrafiltration, nous avons fixé les conditions expérimentales comme suit :

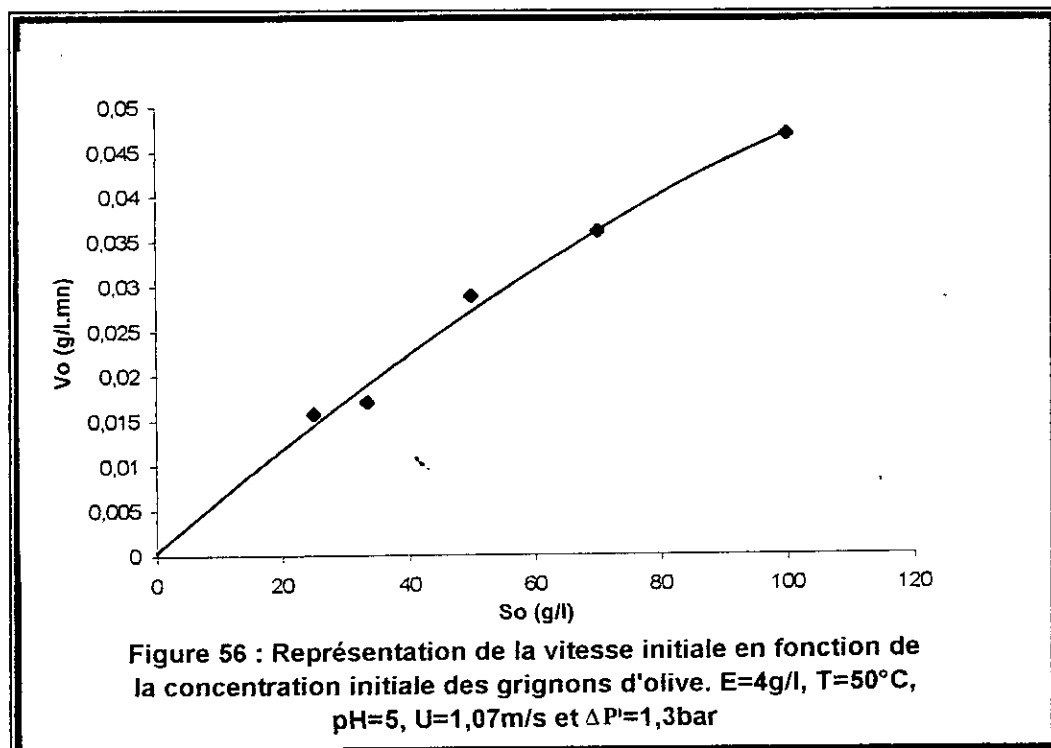
- Température égale à 50°C ;
- pH égale à 5 ;
- Volume réactionnel égal à 400 ml ;
- Concentration d'enzyme de 4 g/l ;
- Vitesse de recirculation de $U=1,07\text{m/s}$ pour une pression transmembranaire égale à 1,3 bar ;
- La concentration en grignons d'olive varie de 25 g/l à 100 g/l ;
- Une durée de fonctionnement de 7 heures.

L'hydrolyse enzymatique des grignons d'olive est menée en phase continu pendant 7 heures ; les sucres réducteurs sont alors dosés au cours du temps pour toute la série d'essais. Les résultats expérimentaux sont représentés par la figure 55.



Nous remarquons, que la concentration des sucres réducteurs augmente avec la concentration des grignons d'olive.

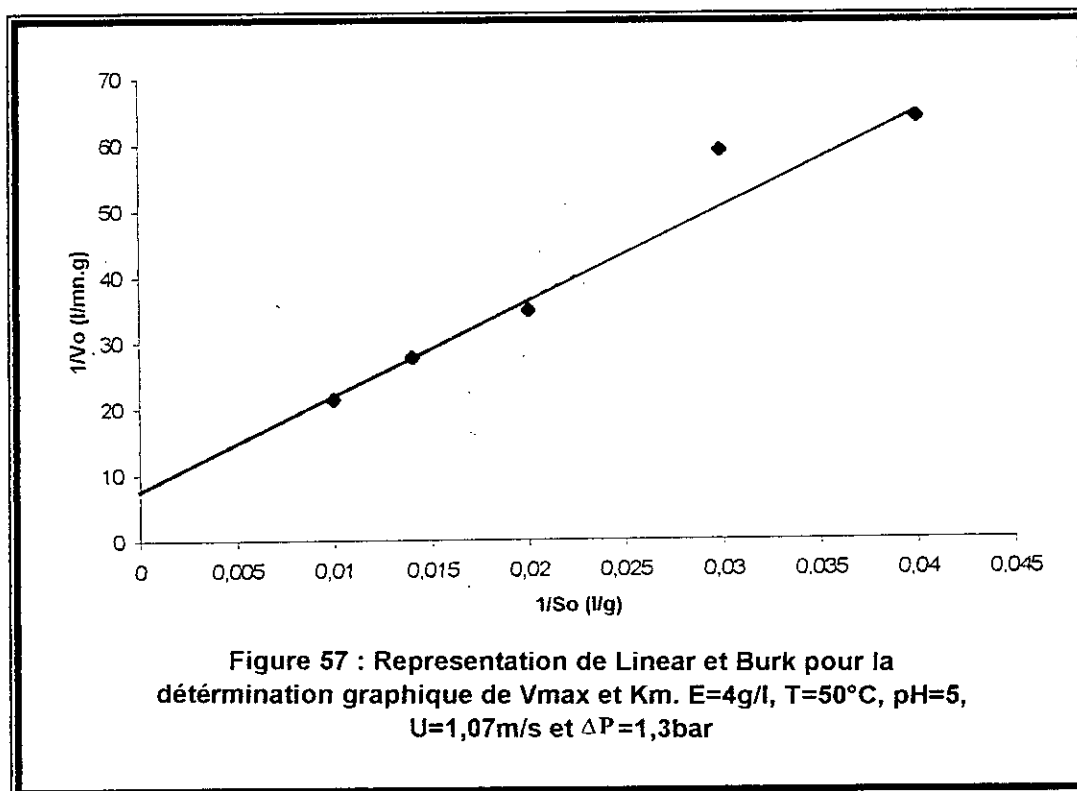
Les vitesses initiales sont déterminées graphiquement par le calcul des pentes à l'origine. Ces dernières sont représentées en fonction des concentrations initiales en grignons d'olive (figure 56).



Nous constatons que les vitesses initiales v_0 augmentent avec les concentrations initiales S_0 , cette évolution tend à se stabiliser au delà des concentrations de l'ordre de 100g/l. Ce résultat est différent de celui obtenu en réacteur discontinu, où un optimum a été obtenu pour une concentration de 33,4 g/l. L'existence d'un phénomène d'inhibition a été donc confirmée pour le réacteur discontinu.

Dans le cas présent (réacteur continu), nous avons pu traiter une concentration trois fois plus élevée, sans observer une décroissance des vitesses initiales. Par ailleurs, nous nous sommes limités à cette concentration à cause de l'empatement de la solution et le bouchage du dispositif d'ultrafiltration

La représentation en double inverse de LINEWEAR-BURK : $1/v_0=f(1/S_0)$ en figure 57, permet le tracé d'une droite de pente K_m/v_{max} et qui coupe l'axe des abscisse en $-1/K_m$. Le coefficient de corrélation R^2 est de 0,954.



La cinétique de l'hydrolyse enzymatique des grignons d'olive en réacteur continu à membrane, suit parfaitement le type MICHAELIS ET MENTEN et peut être exprimée par la relation suivante :

$$v = v_{max} \cdot S / (S + K_m)$$

Les constantes cinétiques K_m et v_{max} déterminées graphiquement sont :

$$K_m = 214 \text{ g/l}$$

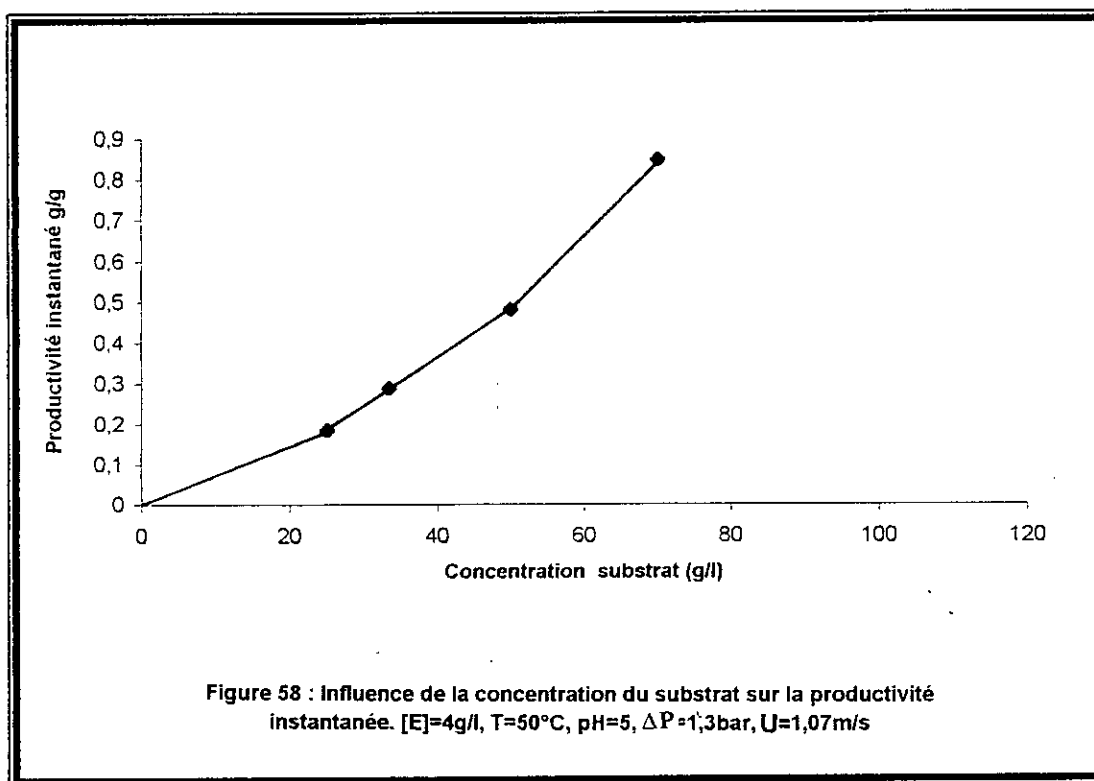
$$V_{max} = 0,133 \text{ g/l.mn.}$$

Comparées à celles obtenues dans le mode discontinu, la constante K_m est trois (03) fois moins élevée en réacteur continu, quant à la vitesse maximale v_{max} , elle est de même ordre de grandeur qu'en réacteur discontinu.

Par définition, K_m est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat. Plus K_m est grand plus la dissociation du complexe E-S est grande, et par conséquent l'affinité de l'enzyme pour le substrat est faible.

D'après nos résultats, la cellulase présente plus d'affinité pour la cellulose en réacteur continu qu'en réacteur discontinu.

Par ailleurs, la représentation de l'évolution de la productivité instantanée obtenue après 6 heures d'hydrolyse, en fonction de la concentration initiale des grignons d'olive (figure 58), montre que celle-ci augmente avec la concentration du substrat.



En définitive, une concentration de grignons d'olive de 70 g/l, sera choisie comme étant la concentration optimale pour l'hydrolyse enzymatique en continu à cause de l'empatement de la solution aux concentrations plus élevées.

VIII-3-6/ Evolution de la concentration des sucres à concentration maximale de substrat ($S_0 = 70\text{g/l}$) :

L'expérience consistait à effectuer un essai d'hydrolyse en continu sous les conditions opératoires optimales suivantes :

$[S]=70\text{g/l}$

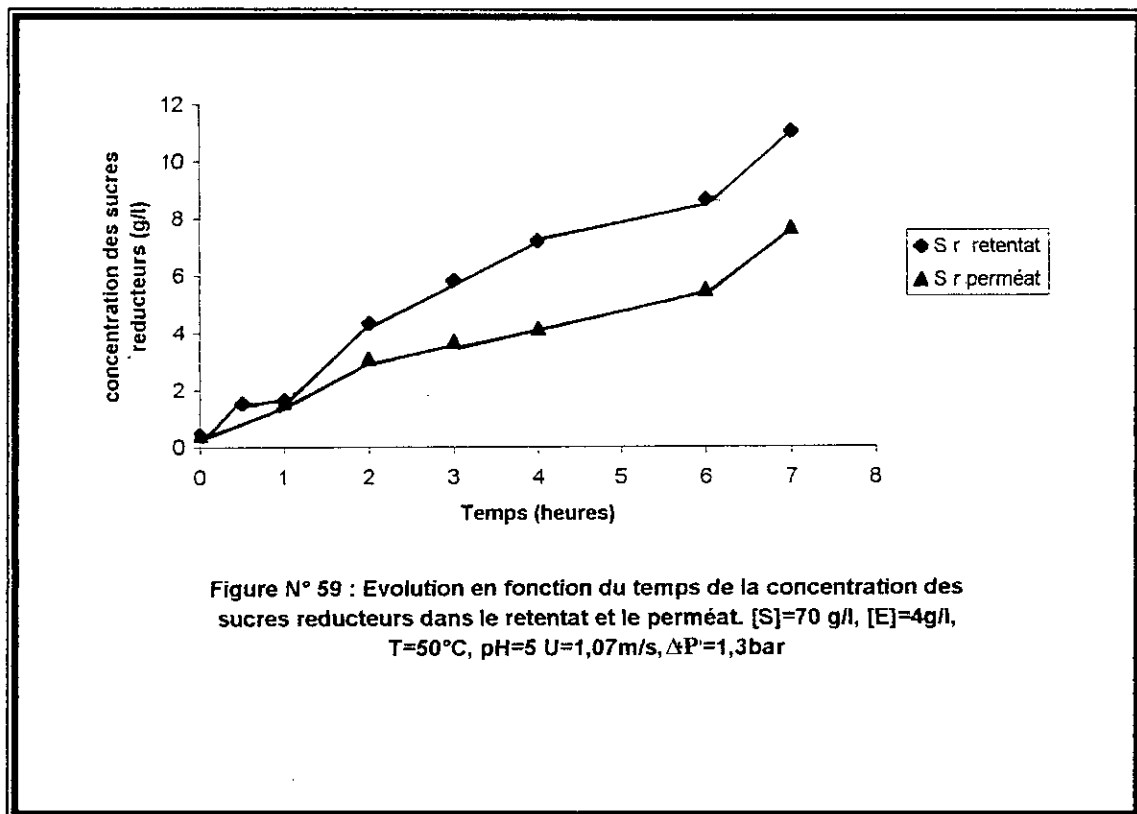
$[E]=4\text{g/l}$

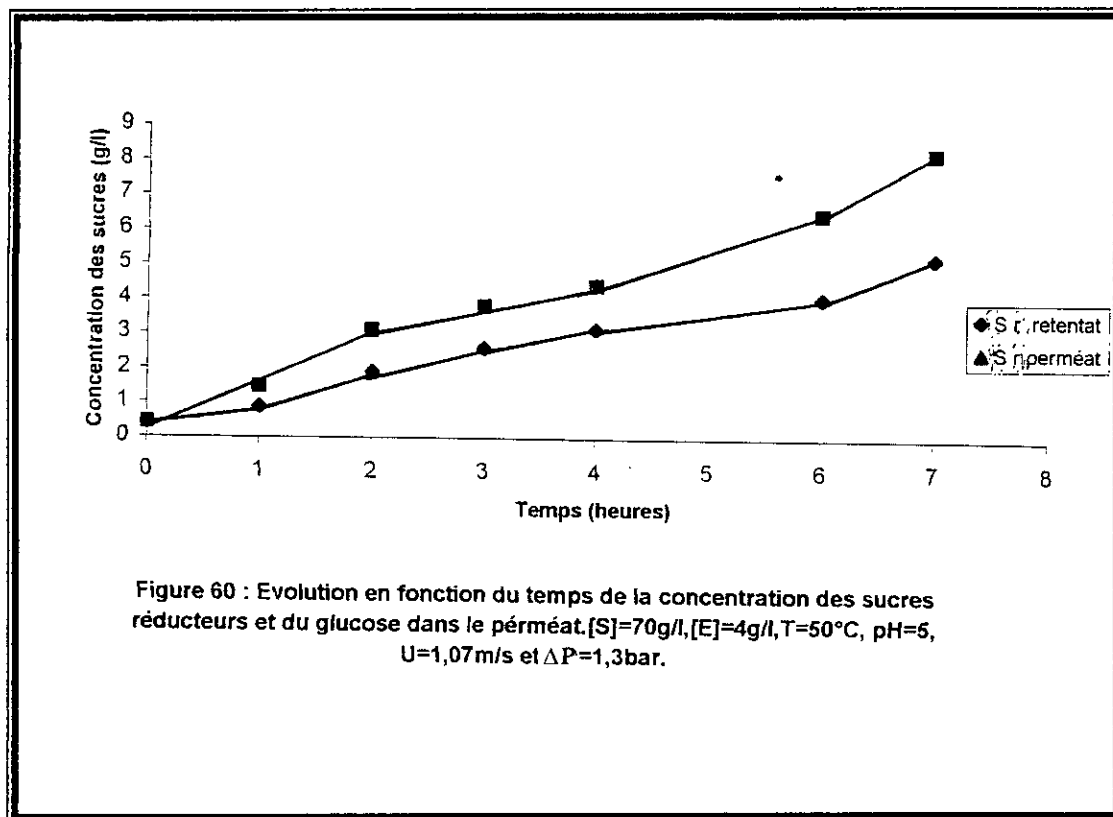
$V=400\text{ml}$

$U=1,07\text{m/s}$ et $\Delta P=1,3\text{ bar}$

Durée de l'expérience= 7h .

L'évolution de la concentration des sucres réducteurs dans le rétentat et dans le perméat, et l'évolution de la concentration du glucose dans le perméat sont représentées par les figures 59 et 60. Nous constatons que :





- La concentration des sucres réducteurs dans le retentat est à tout instant supérieure à celle du perméat. Ceci signifie que la membrane utilisée ne laisse passer qu'une quantité partielle des sucres, ce sont vraisemblablement des sucres de faible poids moléculaire.
- La concentration du glucose dans le perméat est inférieure à celle des sucres réducteurs. Pour autant que nous puissions en juger, il y a probablement accumulation de produits d'hydrolyse dans le retentat. Des analyses du retentat et du perméat par HPLC auraient permis de préciser la composition de l'hydrolysât en polysaccharides et de savoir s'il y avait effectivement une accumulation de ces polysaccharides.

VIII-3-7/ Etude du bilan de matière dans un réacteur continu à membrane :

L'équation du bilan de matière dans ce cas a été déterminé au chapitre IV (équation 8) :

$$v_{\max} \theta / K_m = X \cdot S_0 / K_m + X / (1-X)$$

Avec $X = (S_0 - S) / S_0$ et $\theta = V / F$.

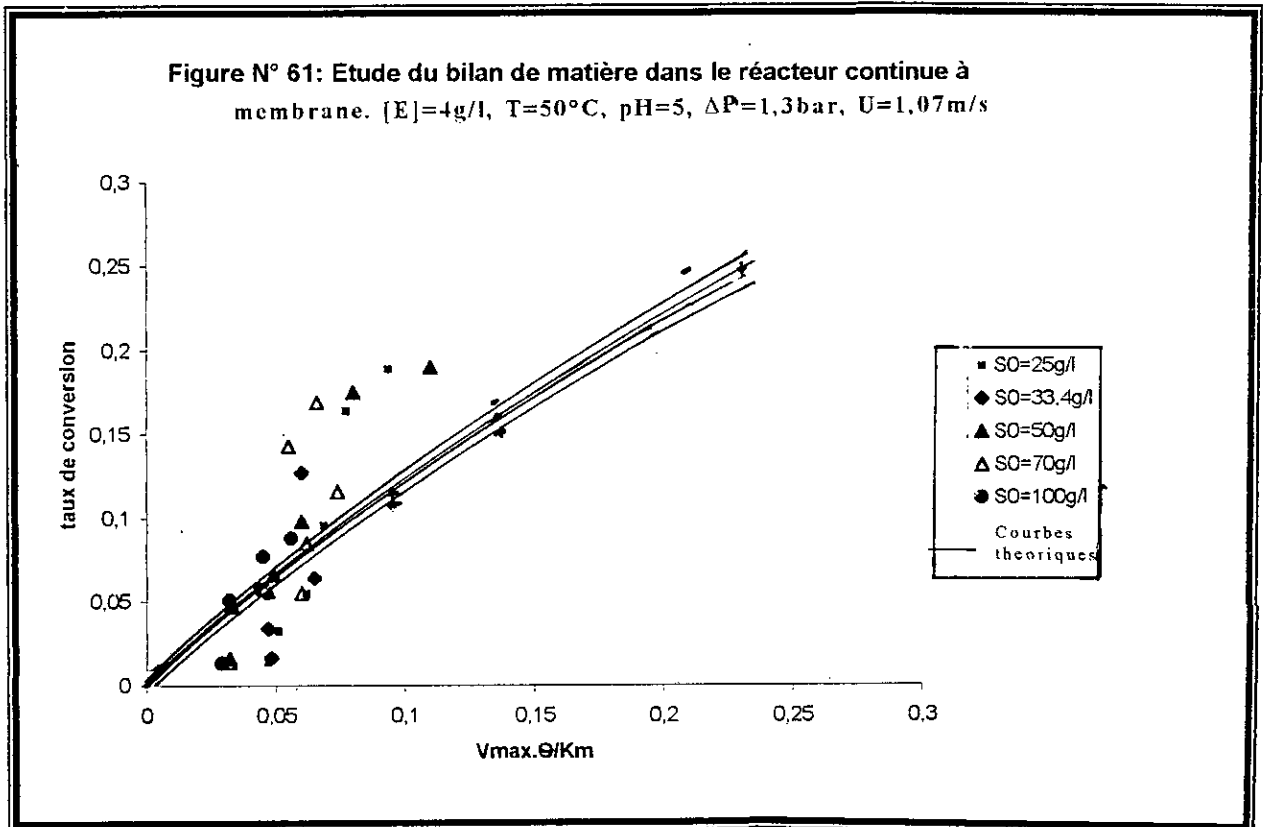
En remplaçant chaque paramètre par sa valeur, nous obtenons :

$$0,0006 \theta = X S_0 / 250 + X / (1-X) \quad \text{avec} \quad K_m = 214 \text{ g/l} \quad \text{et} \quad v_{\max} = 0,133 \text{ g/l.mn}$$

Le taux de conversion X est représenté en figure 61 en fonction de $v_{\max} \theta / K_m$ pour toute la série d'expériences effectuées.

Les courbes expérimentales sont déterminées à partir des données expérimentales (V, J, S, E) [72].

Les courbes théoriques sont déterminées par un simple remplacement de $K_m = 214 \text{ g/l}$ et $v_{\max} = 0,133 \text{ g/l.mn}$ et de S_0 la concentration introduite initialement.



Nous remarquons que les données expérimentales sont plus ou moins proches des courbes théoriques dans l'intervalle de temps étudié, L'écart observé est probablement dû à la difficulté de maintenir les conditions opératoires constantes, et à la complexité du mélange réactionnel.

Nous constatons que les taux de conversion ne dépassent pas 0,2. En effet, il nous était difficile de réaliser des essais d'une durée supérieure à 7 heures, et sur une telle période, le rendement de saccharification atteint est de 20 % seulement (car la réaction est très lente et nécessite des durées très longues pour s'accomplir).

Le rendement de saccharification maximal atteint pour une concentration de grignon d'olive de 70 g/l, est de 20% pour les sucres réducteurs, dont 13% de glucose après 7 heures d'hydrolyse.

Cependant, pour atteindre des taux de conversion élevés, et augmenter ainsi significativement la productivité du bioréacteur, il faudra particulièrement prolonger la durée des expériences en continu, ou utiliser de fortes concentrations de cellulase, et prévoir une phase de discontinu avant d'entamer la phase continue.

Conclusion :

Les essais d'hydrolyse en continu nous ont permis de constater que les conditions hydrodynamiques influent sur les performances du bioréacteur à membrane.

En effet, la vitesse de recirculation affecte fortement le flux du perméat, le rendement de saccharification et la productivité du bioréacteur. Les meilleurs résultats sont obtenus pour la vitesse de recirculation la plus élevée ($U=1,07\text{m/s}$). Par contre, la pression transmembranaire influe moins fortement sur le rendement de saccharification.

La membrane utilisée semble être acceptable du point de vue rétention de l'enzyme et du substrat.

La cinétique de l'hydrolyse enzymatique suit parfaitement le modèle de Michaelis et Menten. Les constantes cinétiques sont : $K_m= 214 \text{ g/l}$ et $v_{\max}=0,133\text{g/l.mn}$. L'examen de la constante d'affinité K_m montre que l'enzyme a plus d'affinité pour son substrat en réacteur continu qu'en réacteur discontinu.

L'utilisation du réacteur continu nous a permis de traiter des concentrations de grignons d'olive trois fois plus élevées qu'en réacteur discontinu sans observer d'inhibition.

Conclusion Générale

« Tout est dit... tout reste à faire. »

CONFICIUS

Conclusion

Notre travail avait pour objectif l'étude de l'hydrolyse enzymatique d'un résidu lignocellulosique : grignon d'olive, dans un réacteur discontinu simple, puis dans un réacteur continu couplé à un procédé membranaire : l'ultrafiltration.

L'étude des caractéristiques chimiques des grignons d'olive a montré, que ce dernier est riche en fraction carbohydate (71% dont 46% de cellulose) et faible en fraction azotée (7%), témoignant ainsi de sa faible valeur énergétique et de sa faible valeur nutritionnelle dans le cas où il est destiné à l'alimentation du bétail.

L'étude du prétraitement chimique (à la soude) des grignons d'olive a montré que ce prétraitement est efficace dans les conditions opératoires suivantes :

- $[\text{NaOH}] = 5 \text{ g/l}$
- Une température de 100°C
- Une durée de traitement de une heure.

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

Nous avons ensuite déterminé les conditions opératoires optimales pour l'activité catalytique de la cellulase qui sont : Température = 50°C et $\text{pH} = 5$.

L'activité de la cellulase est fortement affectée par les hautes températures. En effet, un chauffage à 60 et 70°C pendant 5 heures a fait chuter l'activité enzymatique à 20% et 15% respectivement.

En batch, l'enzyme cellulolytique a permis de produire un hydrolysât contenant au maximum 48% de sucres réducteurs dont 16% de glucose dans les conditions opératoires suivantes : $\text{pH} = 5$, $T = 50^\circ\text{C}$, concentration d'enzyme de 4 g/l , une concentration de grignons d'olive de $33,4 \text{ g/l}$, et une durée d'hydrolyse de 24 heures.

De plus, l'étude de la cinétique d'hydrolyse enzymatique a révélé l'existence d'une inhibition, qui apparaît à des concentrations de grignons d'olive supérieures à $33,4 \text{ g/l}$. Les constantes cinétiques relatives à ce système sont :

$$\begin{aligned}v_{\max} &= 0,1 \text{ g/l.mn} ; \\K_m &= 746,44 \text{ g/l} ; \\K_s &= 0,003 \text{ g/l}.\end{aligned}$$

L'étude de l'effet du cellobiose sur le rendement de saccharification a montré que ce dernier exerce une inhibition sur le système enzymatique, l'effet inhibiteur apparaît déjà à une concentration de 5 g/l de cellobiose et est plus fort à 10 g/l de cellobiose.

En réacteur continu, la membrane M5 (10kDa), semble être acceptable du point de vue rétention de l'enzyme et du substrat. En revanche, les produits d'hydrolyse (sucres) ne passent pas en totalité à travers cette membrane.

Le réacteur continu possède les meilleures performances à une vitesse de recirculation de 1,07 m/s et une pression transmembranaire de 1,3 bar. Celles-ci permettent d'obtenir un rendement de saccharification de 47% et une productivité du bioréacteur de 0,22 g/g après 12 heures de fonctionnement en deux phases.

L'étude de la cinétique enzymatique en réacteur continu a montré que celle-ci est de type Michaelien. La constante cinétique K_m est trois fois moins élevée que celle obtenue en réacteur discontinu, témoignant ainsi de la grande affinité de la cellulase pour la cellulose en réacteur continu. Les constantes v_{max} sont de même ordre de grandeur dans les deux cas.

L'utilisation du réacteur continu, nous a permis de lever l'inhibition observée en discontinu et par la même de traiter des concentrations de grignons d'olive trois (3) fois plus élevées.

A cause des contraintes techniques que nous avons rencontrées, le bilan de matière n'a pu être étudié et exploité que dans un intervalle de temps restreint (durée des expériences en continu était de 7 heures). Le bilan de matière établi pour cette période, nous a permis d'atteindre des taux de conversion de l'ordre de 0,2 seulement et de constater que le bioréacteur est parfaitement agité. Au delà, nous ne pouvions nous prononcer sur la stabilité du bioréacteur.

Pour ce qui est des suites à donner à notre travail, nous suggérons :

- Vu les concentrations minimales obtenues en glucose, l'ajout au système enzymatique utilisé d'un excès d'enzyme β -glucosidase serait nécessaire.
- Il serait très utile de réaliser de nouvelles expérimentations, qui devront être suivies sur des durées aussi longues que possible pour pouvoir contrôler les différents paramètres de fonctionnement et de manière aussi, à parvenir à une bonne reproductibilité des essais.
- Il serait plus intéressant d'utiliser une membrane d'ultrafiltration de seuil de coupure plus élevé, afin d'éviter l'accumulation de certains produits d'hydrolyse et permettre leur récupération à travers la membrane.
- Une analyse par HPLC du rétentat et du perméat serait souhaitable.
- L'étude de la stabilité du bioréacteur serait nécessaire

Bibliographie

- [1] Journal El watan (1995) . *L'olivier, un arbre béni des dieux*, 19 Décembre
- [2] FLANDORY L.(1995) . *L'olivier : moins de kilos, plus de watt*, Biofutur., 26-28 Décembre.
- [3] C.O.I (1989) . *Documentation*, Ed Française, N°25, Octobre.
- [4] TALANTIKIT M.et AIT AMAR H.(1984) . *Composition acide des huiles d'olive des trois cultivars d'Algérie* . Olivea 5^{ème} année, N°23.
- [5] Donnée du ministère de l'équipement 1994/1995.
- [6] FRANCOIS R.(1974) . *Les industries des corps gras* . Ed tech et doc, Genève.
- [7] NEFZAOUI A.(1985) . *Valorisation des résidus lignocellulosiques dans l'alimentation des ruminants par les traitements aux alcalis* . Thèse d'état, Université catholique de Louvain-La-Neuve. Belgique.
- [8] PALLOT U.et CAPELLA P. (1983) . *Les sous produits de l'olivier* . Nouvel olivier, 4,4-8.
- [9] ALIBES S.et BERG (1988) . *Valorisation des produits de l'olivier* . Nouvel olivier, 4, 4, 123-128
- [10] ABDOULI A. (1988) . *Valorisation alimentaire des grignons d'olive dans l'alimentation des ruminants* . PFE , INA.
- [11] POURQUIE J. et VANDECASTELLE J. (1993) . *Conversion des composés lignocellulosiques par hydrolyse enzymatique*. Dans Biotechnologie , SCRIBAN . Ed tech et doc, Lavoisier, Paris.
- [12] MOURANCHE A. et COSTES C. (1985). *Hydrolases et dépolymérase* . Ed Gauthier-Villard, Paris.
- [13] PILET S. (1971) . *Les parois cellulaires :Structure et fonctions cellulaires* . Ed Masson.
- [14] LEHNINGER A.L.(1977) . Biochimie. 2^e Ed , Flammarion, Paris.
- [15] MONTIES B.(1980) . *Les polymères pariétaux et alimentaires non azotés* . Ed Gauthier-Villard.
- [16] CHAPEVILLE.F.(1974) . *Biochimie* . Ed Herman, Paris.
- [17] WILLIAM R.W. et HENRY E. (1987) . *Hemicellulose digestibility by steers fed cured hay and drum-dehydrated Alfafa and Coastal Bermuda grass*. J. Agric. Food. Chem, 35, 698-704.

- [18] KENT K.T. HYGUCHI.T et CHANG H.M. (1981). Lignin biodegradation : Microbiology chemistry and potential application, volume 1, 2^{ème} Ed Boca Raton, Floride.
- [19] SUN B.L. et KID J.A. (1983). *Structural properties of cellulose and cellulase mechanisms*. Biotech and bioeng, 25, 33-35.
- [20] GHARPURAY M. YOUNG HUYUN L. et FAN L.T. (1983). *Structural modifications of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis*. Biotech. and bioeng, 25, 157-172.
- [21] VINOD P.P. (1984). *Effect of cristallinity and degree of polymerisation of cellulose enzymatic saccharification*. Biotech. and bioeng, 26, 1219-1222.
- [22] YOUNG HUYUN (1983). *Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose II*. Biotech and bioeng, 25, 939-966.
- [23] SUN B.L. et DEMAY D.Y. (1982). *Adsorption of cellulase on cellulose : Effect of physicochemical properties of cellulase on adsorption and rate of hydrolysis*. Biotech. and bioeng, 24, 2137-2153.
- [24] VALLANDER L. et ERICKSON K.E. (1994). *Production of ethanol from lignocellulosic materiels : State of art*. Advances in biochemical engineering /Biotechnology, 42, 63-95.
- [25] FAN L.T. et YOUNG HUYUN L. (1994). *The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis*. Advances in biochemical engineering /Biotechnology, 42, 156-182.
- [26] SUMUDI. S. et MATSUZAKI K. (1994). *Effect of steam explosion treatment on enzymatic hydrolysis of palm cake and fiber as solid wastes and natural ressources*. Journal of fermentation and bioengineering, 77, 3, 326-328.
- [27] AUGERINOS G. et WANG D. (1988). *Selective solvant delignification of fermentation enhancement*. Biotech and bioeng, 25, 67-83.
- [28] MORRISON I.M. (1988). *Influence of chemical and biological pretreatments on the degradation of lignocellulosic material by biological systems*. Journal of science food agriculture, 42, 295-304.
- [29] JAVILLIER M. et POLONOVSKI M. (1964). *Traité de biochimie*. Tome 2. Ed. MASSON, Paris.
- [30] SZCZODRAK J. et SKLODOWSKA M.C. (1988). *Production of cellulases and xylanases by Trichoderma Reesei on pretreated wheat straw*. Acta biotechnology, 8, 509-515.
- [31] DUCROO P. (1982). *Utilisation industrielle des enzymes*. Ind. Aliment. Agric, 39, 401-416.

- [32] DORAN G.B. et ALDRICHNH C. (1994) . *Saccharification and fermentation of sugar cane bagasse by Klebsiela oxytoca P2* . Biotech. and bioeng, 4, 240-247.
- [33] COLLIN J.C. et DELECOURT R. (1988) . *Actualités des industries alimentaires et agroalimentaires*, 452-459, Juin.
- [34] VAN BELLE M. et MEVRENS M. (1988) . *Enzymes in foods and feed*. Revue des fermentations des industries alimentaires, 124-135.
- [35] BOUSSAID F. (1985) . *Etude de la dénitrification in situ à l'aide de substrats cellulosiques* .Thèse de Doctorat, Université de Montpellier, France.
- [36] YOUNG HUYUN L. et FAN L.T. (1982) . *Kinetic studies of hydrolysis of insoluble cellulase : Analysis of the initial rates* . Biotech.and bioeng , 24, 2383-2406.
- [37] BELTRAME P.L. et CARNITI P. (1984) . *Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials : A kinetic study*. Biotech and bioeng , 26, 1233-1238.
- [38] GUSAKOV V. et SINITSY P. (1992) . A theoretical analysis of cellulose product inhibition : Effect of cellulase binding constant, enzyme /substrate ratio, β -glucosidase activity on the inhibition pattern . Biotech and bioeng, 40, 663-671.
- [39] CUVELLIER G.F. (1988) . *Réacteurs enzymatiques à enzyme libre et à enzyme immobilisée*. Dans Biotechnologie, R. SCRIBAN, 422-430. Ed. Tech. et doc. LAVOISIER.
- [40] COUTOULY G. (1991) . *Génie enzymatique* . Ed Masson, Paris.
- [41] BAILEY J. (1986) . *Biochemical engeneering fondametals*. 2^e Ed. Mac GRAW-HILL.
- [42] MEIRELES M. et AIMAR P. (1992) . *Les techniques à membranes micro et ultrafiltration*. Le techniscope de biofutur, N° 11, 3-18.
- [43] BRUN G.P. (1989) . *Procédés de séparation par membrane*. Ed. Masson, France.
- [44] CHERYAN M. (1986) . *Ultrafiltration handbook*. Technomic, U.S.A.
- [45] RAO G.R. et GRANDISON G. (1994) . *Flux pattern and fouling of membrane during ultrafiltration of some dairy products*. J. SC. Food . Agri., 66, 563-571.
- [46] GAOUAR O. (1995) . *Etude d'un réacteur continu à membrane d'ultrafiltration pour la conversion enzymatique de l'amidon de manioc en sirop de maltose*. Thèse doctorat, université de Montpellier, France.
- [47] MOKRANE H. (1997) . *Valorisation de l'hémoglobine bovine par hydrolyse enzymatique*. Thèse de Magister , ENP, Algérie.
- [48] WIJMANS J. et NAKAO S. (1986) . *Hydrodynamic resistance of concentration polarisation boundary layers in ultrafiltration*. Journal of membrane science, 20, 249-252.

- [49] WIJMANS J. et NAKAO S. (1984). *Flux limitation in ultrafiltration, osmotic pressure and gel layer model*. Journal of membrane science, 20, 115-119.
- [50] VACCARINO C. et TRIPODO M.M. (1982). *Amélioration de la valeur nutritionnelle des grignons d'olive par un traitement au carbonate de sodium*. Oléagineux, 37, 6, 307-312, Juin.
- [51] AGUILERA J. et MOLINA E. (1986). *Valorisation nutritive d'un grignon d'olive traité à la soude*. Ann. Zootech., 35 (3), 205-218.
- [52] FEIST W.C. et BAKER A.J. (1970). *Alkali requirements for improving digestibility of hard woods by rumen microorganism*. J. Anim. Sci, 30, 832-840.
- [53] BERGER L. et KLOPFERSTEIN M. (1980). *Effect of sodium hydroxyde treatment on rate of passage and ruminal fiber digestion*. J. Anim. Sci., 50 , 745-749.
- [54] FORD C.W. (1978). *Effect of partial delignification on the invitro digestibility of cell wall polysaccharies*. Aust. J. Agri. Res , 29, 1167-1175.
- [55] DUSTERHOFT E.M. et VORAGEN G. (1993). *Parameters affecting the enzymatic hydrolysis of oil seed meals lignocellulosic by products of the food industry*. Biotech. and bioeng, 25, 923-930.
- [56] MOLINA E., BOZA J. et AGUILERA J.F. (1984). *Traitement à l'alcalis du grignon d'olive tamisé épuisé. Effet sur la composition chimique et la digestibilité « in vitro »*. Dans : Valorisation des sous-produits de l'olivier. Réunion du groupe de travail organisé par le projet régional d'amélioration de la production oléicole. FAO, Madrid, 17-18 novembre 1983, 117-121.
- [57] MOSS A.R., GUVEN D.I. et EVERINGTON J.M. (1990). *The effect of sodium hydroxyde treatment on the chemical composition, digestibility and digestible energy content of wheat, barley and oat straw*. Anim. Feed. Sci. Technol, 29, 73-84.
- [58] SUSUMU O.I., MATSUZAKI. K., IZUKA M. et TANIGUHI M. (1994). *Effect of steam explosion on enzymatic hydrolysis of palm cake and fiber as solid wastes and natural ressources*. Journal of fermentation and bioengineering, 77, 3, 326-328.
- [59] MILLE L.G. (1959). *Use of denitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical chemistry, 31, 3, Mars.
- [60] MANDELS M. et ANREOTT R. (1976). *Measement of saccharifying cellulase*. Biotech. and bioeng symp, N°6, 21-33.
- [61] LINKO M. (1977). *An evaluation of enzymatic hydrolysis of cellulosic materials*. Advances in biochemical engeneering . Ed Ghose Springer Verlag , Berlin, 25-48.
- [62] VANBELLE M. et BERGTING G. (1989). *Screening of fungal cellulolytic préparation for application in ensiling process*. Dans. Enzym system for lignicellulose degradation (CEE). Ed. Goughlan M.P, 357-369.

- [63] MOLINA.E., NEFZAOUI.A. et VANBELLE.M.(1987) . Subproducts y residuos agroalimentarios : Methodos de analisis y control de calidad . Quimica agricola y alimentaria, 2, 68 ,55-62.
- [64] FURCHT P.W. et SILLA. H. (1990). Comparaison of simultaneous wet milling and enzymatic hydrolysis of cellulose in ball and attrition mill reactors . Biotech and bioeng , 35, 630-645.
- [65] RESEI T.E. et MANDELS M.(1980) . *Stability of the cellulase of Trichoderma Reesei under use conditions*. Biotech and bioeng, 12, 323-335.
- [66] GIAWFRADA. L. (1984) . *Series mecanismes of enzyme desactivation on characterization of intermediate forms*. Biotech and bioeng, 17, 877-882.
- [67] GUSAKOV A.V. et SINITSY P.(1987) . *Factors affecting the enzymatic hydrolysis of cellulose in batch and continuous reactors*. Biotech and bioeng, 19, 906-910.
- [68] DESHPANDE M. et ERIKSON G. (1984) . *Reutilisation of enzymes for saccharification of lignocellulosic materials*. Enzyme Microb. Techol, 6, 28, Aout , 337-340.
- [69] SZCZODRAK. J.(1988) . *The natur of enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol*. Biotech and bioeng, 32, 771-776.
- [70] THOMAS H , TASSINAR, CHARLES F. et SPANO L. (1982) . Technology advances for continuous compression milling pretreatment of lignocellulosics for enzymatic hydrolysis. Biotech and bioeng, 24, 1495-1505.
- [71] FOX D.J et GRAY P.P. (1989) . *Alkalis and steam pretreatments of lignocellulosic materials*. J. Chem. Tech. Biotech, 44, 135-146.
- [72] GUSAKOV V.A., SINITSY A. et KLYSOV A.A. (1987) . A theoretical comparison of the reactors for enzymatic hydrolysis of cellulose. Biotech and bioeng, 17, 898-900.
- [73] RIVERS D.B. et EMERT G.H.(1988) . Factors affecting the enzymatic hydrolysis of municipal solid waste components. Biotech and bioeng, 31, 278-281.
- [74] VALLANDER L. et ERIKSON K.E.(1983) . Enzym saccharification of pretreated wheat straw. Biotechnology in the pulp and paper industry, 90-112, Septembre.
- [75] SZCZODRAK. J.(1988) . The use of cellulase from a β -glucosidasehyper producing mutant of Trichoderma Reesei in simultaneous saccahrification and fermentation of weat straw . Biotech and bioeng, 33, 1112-1116.
- [76] SZCZODRAK. J.(1986) . *Intensification of cake saw dust enzymatic hydrolysis by chemical hydrothermal pretreatment*. Biotech and bioeng, 28, 504-510.
- [77] DOSHIMA. H. et KURAKAKE M. (1991) . *Enzyme activity of cellulase and its change during hydrolysis*. Applied biotech, 3, 253-266.

- [77] **DOSHIMA H. et KURAKAKE M. (1991)** . *Enzyme activity of cellulase and its change during hydrolysis*. Applied biotech, 3, 253-266.
- [78] **DESAI S.G. et CONVERSE A.O. (1997)** . *Substrate reactivity as a function of the extent of reaction enzymatic hydrolysis in lignocellulose*. Biotech and bioeng, 56, 20, 650-655, Decembre.
- [79] **HENLEY R.J. (1980)** . *Enzymatic saccharification of cellulose in membrane reactors*. Enzym. Microbiol. Technol, Vol 2, Juillet.
- [80] **ALFANI F. (1982)** . *Kinetics of enzymatic saccharification of cellulose in a flat membrane reactor*. Biomass, 2, 245-253.
- [81] **HALET F. (1997)** . *Traitement des rejets liquides d'huilerie d'olive par procédé membranaire* . Thèse de Magister, ENP, Algérie.
- [82] **CHERYAN M. et MIHEIM A. (1990)** . *Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor*. Journal of food science, 55, 2, 381-386.
- [83] **BALMANE H. (1988)** . *Utilisation de l'ultrafiltration pour la traitement des eaux*. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier.
- [84] **BRESSOLIER P. et JULIAN R. (1987)** . *Hydrolysis of plasmé proteins in continued stirred reactor ultrafiltration : Reactor performance and modeling*. Biotech and bioeng, 3, 650-658.

ANNEXE 1

Méthode de JELDAHL :

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

a- Minéralisation : on ajoute à 2 g d'échantillon 10 ml de H_2SO_4 concentré, chauffer jusqu'à décoloration, poursuivre le chauffage pendant 2 heures.

b- Distillation :

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

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

Ouvrir le robinet puis rincer le réservoir

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

Ouvrir le robinet de vapeur et distiller pendant 5 mn ;

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

c- Le titrage :

Titrer avec H_2SO_4 (N/50) jusqu'à coloration rose mauve, le pourcentage de l'azote est calculé par la formule suivante:

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

Avec Va : Volume d'acide ajouté (ml)

me : Masse de la prise d'essai

d : Densité de l'échantillon à doser.

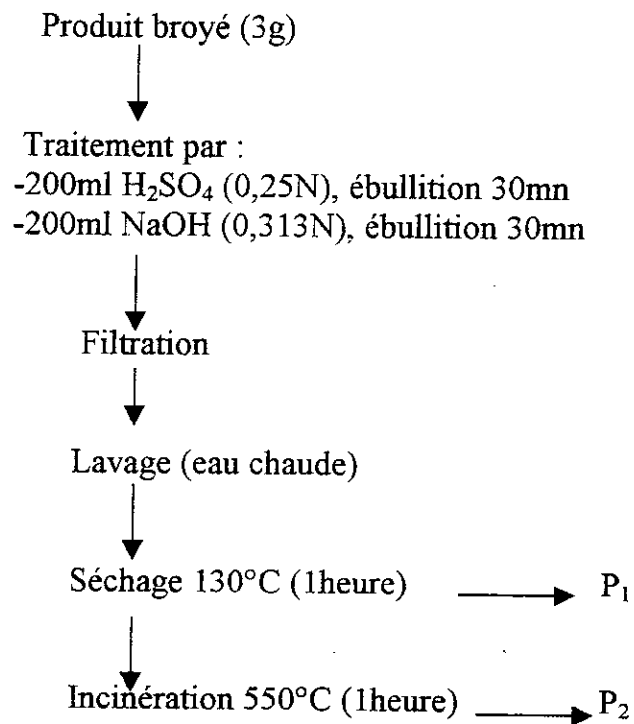
$$\% \text{ protéines} = \% \text{ d'azote total} \cdot 6,25.$$

ANNEXE 2

Détermination de la cellulose : Méthode de WEENDE (1809) [15] :

Par définition et selon la **norme ISO-AFNOR (NFV O3040, 1977)**, l'insoluble « cellulosique » correspond aux substances perdues lors de l'incinération du produit résistant aux attaques successives acide et alcaline.

Le schémas suivant résume le processus opératoire utilisé :



$$\% \text{ cellulose} = (P_1 - P_2) \cdot 100/3$$

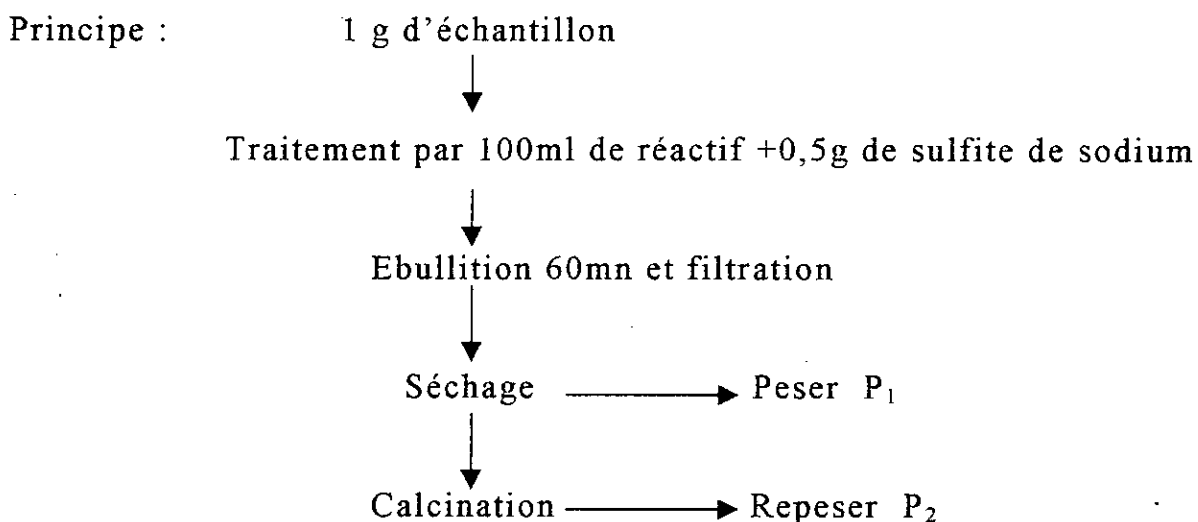
ANNEXE 3

Méthode de fractionnement de Van-Soest [15] :

Cette technique permet d'isoler successivement trois résidus :

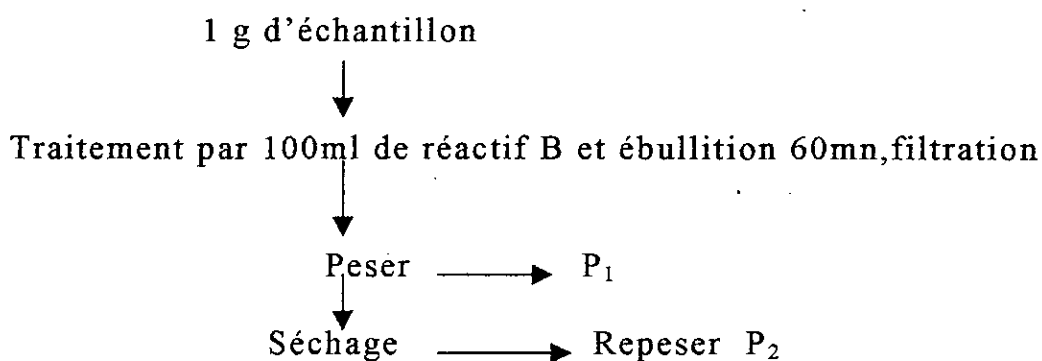
- NDF(neutral detergent fiber) qui constitue l'essentiel de la paroi végétale ;
- ADF (acid detergent fiber) qui correspond à la lignocellulose ;
- ADL (acid detergent lignine) qui correspond à la lignine.

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



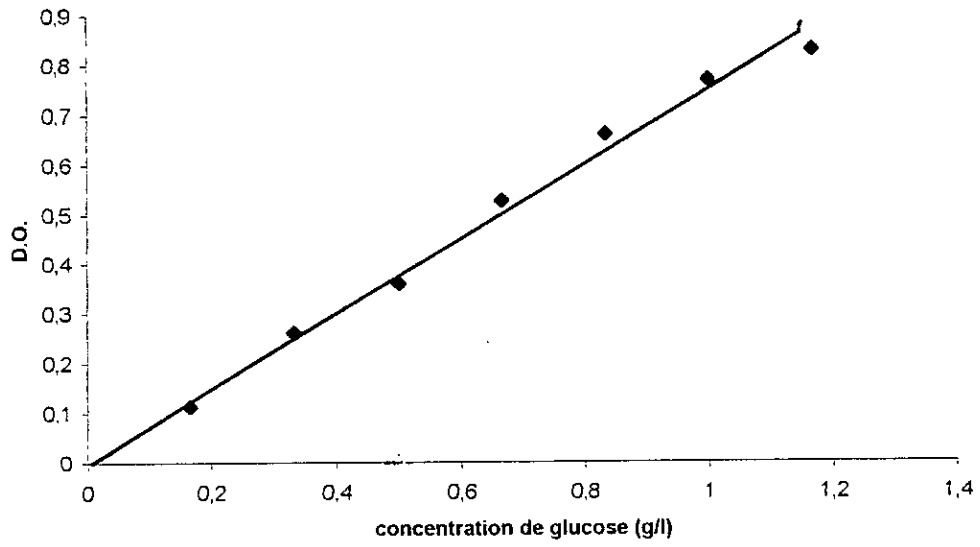
$$D.N \%=(P_1-P_2).100$$

Réactif B : solution de bromure ethyltrimethylamonium en milieu sulfurique.

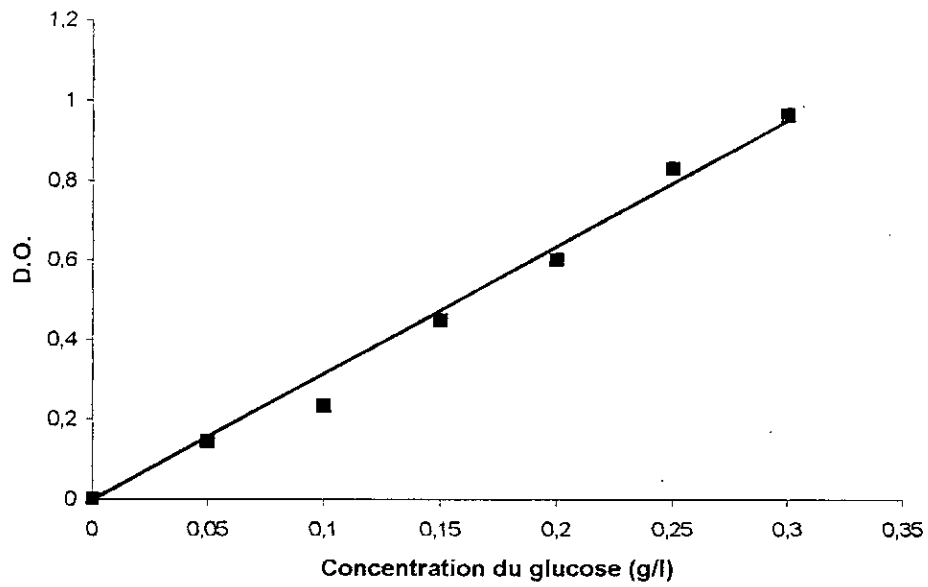


$$D.A\%=(P_2-P_1).100$$

Courbe d'etalonnage des sucres reducteurs



Courbe d'etalonnage du glucose



Notations :

M.S	Matière sèche (%)
M.A.T	Matières azotées totales (% M.S)
M.G	Matières grasses (%M.S)
C.T	Cendres totales (%M.S)
C.B	Cellulose brute (%M.S)
N.D.F	Neutral detergent fiber
A.D.F	Acid detergent fiber
A.D.L	Acid detergent lignin
E	Concentration en enzyme (g/l)
S	Concentration en substrat (g/l)
Ar	Activité enzymatique résiduelle (%)
S ₀	Concentration initiale en substrat (g/l)
P	Concentration en produits (g/l)
V	Vitesse d'hydrolyse enzymatique (g/l.mn)
K _i	Constante d'inhibition (g/l)
V _{max}	Vitesse maximale d'hydrolyse enzymatique (g/l.mn)
K _m	Constante de Michaelis-Menten (g/l)
K _s	Constante d'inhibition par le substrat (g/l)
V	Volume du réacteur (l)
t	Temps (h)
X	Taux de conversion
θ	Temps de séjour moyen (h)
F	Débit (l/h)
r	Fraction soutirée du réacteur
J _v	Flux du perméat (l/h.m ²)
r _p	Rayon moyen des pores (m)
e	Épaisseur de la membrane (m)
N	Nombre de pores
ΔP	Pression transmembranaire (bar)
L _p	Pérméabilité à l'eau (l/h.m ² .bar)
D	Coefficient de diffusion (m ² /s)
δ	Épaisseur de la couche de polarisation (m)
A	Activité enzymatique
Q _p	Débit de perméat (l/h)
S _m	Surface d'échange de la membrane (m ²)
P _i	Productivité instantannée (g/g)
C _p	Concentration des produits dans le perméat (g/l)
S _r	Sucres réducteurs (g/l)
C M C	Carboxymethylcellulose

ES	Complexe enzyme - substrat
ESI	Complexe enzyme-substrat-inhibiteur
I	Inhibiteur
EI	Complexe enzyme-inhibiteur
E ₁	Endo et exo-glucanase
E ₂	β-glucosidase
E ₁ ⁱⁿ , E ₂ ⁱⁿ	Enzymes adsorbées
S	Cellulose
G ₂	Cellobiose
G	Glucose
K ₁ , K ₂ , K ₃ , K ₄	Constantes de vitesse