

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

6/96

وزارة التربية الوطنية

MINISTRE DE L'EDUCATION NATIONALE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

DEPARTEMENT : Génie de l'environnement

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

**Hydrolyse enzymatique
d'un rejet d'huilerie
« le grignon d'olive ».**

Proposé par ;
M^{me} D. MAMERI

Etudié par :
M^{elle} CHIKH FARIDA

Dirigé par :
M^{me} D. MAMERI
M^{me} F. HALET

PROMOTION
95 / 96

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التربية الوطنية

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

ECOLE NATIONALE ~~POLYTECHNIQUE~~

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
المكتبة — BIBLIOTHEQUE
Ecole Nationale Polytechnique

DEPARTEMENT : Génie de l'environnement

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

Hydrolyse enzymatique
d'un rejet d'huilerie
« le grignon d'olive ».

Proposé par :
M^{me} D. MAMERI

Etudié par :
M^{elle} CHIKH FARIDA

Dirigé par :
M^{me} D. MAMERI
M^{me} F. HALET

PROMOTION
95 / 96

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

A mes très chers parents

A mes frères et sœurs

A tous mes amis (ies)

A toute ma famille et tous ceux qui me sont chers.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance envers ma promotrice Dr. D. MAMERI, enseignante à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, pour sa disponibilité et son aide très précieuse.

Je remercie vivement M^{me} F. HALET ma copromotrice, post-graduante à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, pour sa présence au laboratoire et tous ses conseils avisés.

Je remercie aussi les membres du jury:

Mr NAMANE	Président de jury
M ^{me} ABDI	Examinatrice
Mr MAZIGHI	Examineur
M ^{me} MAMERI	Promotrice
M ^{me} HALET	Copromotrice

qui ont voulu m'honorer de leur présence et apprécier ce modeste travail.

J'exprime ma gratitude à toute l'équipe du département qui m'a apporté aide et encouragement.

Je ne peux manquer de remercier sincèrement Monsieur MAHFOUD pour son aide et sympathie.

Enfin, j'exprime mes remerciements à tous mes proches et mes amis (ies) qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mon travail.

Titre : *Hydrolyse enzymatique d'un rejet d'huilerie le grignon d'olive .*

Résumé : Notre travail consiste en une étude de l'hydrolyse d'un rejet d'huilerie le grignon d'olive , par voie enzymatique en vue d'une saccharification, après l'avoir caractérisé et prétraité à la soude caustique.

العنوان : *الإمهاة الأنزيمية لنفايات زيت الزيتون.*

ملخص : يتلخص عملنا في دراسة الإمهاة الأنزيمية للنفايات الصلبة الناتجة عن إستخراج زيت الزيتون، و الغرض من ذلك هو الحصول على الغلوسيدات و هذا بعد إستنتاج خواصه الكيميائية و معالجته بالصودا.

Title : *Enzymatic hydrolysis of oil-olive wastes.*

Abstrat : Our work consist to study of an enzymatic hydrolysis of oil-olive wastes to produce sugar. The process is preceeding of characterization and pretreatment with sodium hydroxide.

Abréviations

M.S	Matière Sèche
C.T	Cendre Totale
M.A.T	Matières Azotées Totales
M.G	Matières Grasses
C.B	Cellulose Brute
N.D.F	Neutral Detergent Fiber
A.D.F	Acid Detergent Fiber
A.D.L	Acid Detergent Lignine
S.T	Sucres Totaux
Ca	Calcium
Na	Sodium
K	Potassium
mg	milligramme
g	gramme
L	litre
μ l	microlitre
D.O	Densité optique
E	Enzyme
S	Substrat
V_{max}	Vitesse maximale.
K_I	Constante d'inhibition
V_I	Vitesse initiale
S_0	Concentration initiale en substrat
RH	Rendement d'hydrolyse

SOMMAIRE

I- INTRODUCTION..... 1

II- PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I: Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier.

1- La production oléicole.....	2
2- L'oléiculture et l'industrie oléicole en ALGERIE.....	2
2.1- Situation actuelle de l'oléiculture.....	2
3- Composition de l'olive.....	3
4- définitions des sous produits de l'oléiculture.....	4
5- La composition chimique du grignon d'olive.....	5
6- Estimation quantitative des rejets d'huilerie et impact sur l'environnement.....	7
7- Valorisation des sous-produit de l'oléiculture.....	8

CHAPITRE II: Les résidus ligno-cellulosiques.

1- La cellulose.....	10
2- Les hemicelluloses.....	11
3- Les lignines.....	12

CHAPITRE III: Les enzymes.

1- Définition.....	13
2- Nature des enzymes.....	13
3- Spécificité de la catalyse enzymatique : le site actif.....	13
4- Nomenclature et classification des enzymes.....	13
5- Les celluloses.....	14

CHAPITRE IV: Cinétique enzymatique	16
1- Théorie de Michaelis et Menten.....	16
2- Activité de l'enzyme.....	17
3- Constante de Michaelis « K_m ».....	18
4- Détermination des paramètres K_m et V_{max}	18
5- Variation de $P = f(t)$	20
6- Variation de $V = f(E)$	21
7- Facteurs physiques et physico-chimiques affectant la réaction enzymatique.....	22
7.1- La température.....	22
7.2- Action du pH.....	23
8- Effecteurs d'enzymes : Les inhibiteurs.....	23
8.1- Inhibition compétitive.....	23
8.2- Inhibition non compétitive.....	24
8.3- Inhibition incompétitive.....	25
8.4- Inhibition par le substrat.....	25

CHAPITRE V : Les prétraitements

1- Les prétraitements physiques.....	27
1.1- Le broyage.....	27
1.2- Pyrolyse.....	27
1.3- Irradiation à haute énergie.....	27
1.4- Prétraitement à la vapeur.....	28
2- Les prétraitements chimiques.....	28
2.1- Prétraitements alcalins.....	28
2.2- Prétraitements acides.....	29
2.3- Solvant de la cellulose.....	29
3- Les prétraitements biologiques.....	29

CHAPITRE VI : Hydrolyse enzymatique des résidus ligno-cellulosiques:

1- hydrolyse enzymatique.....	31
2- Le système enzymatique.....	31
3- Régulation enzymatique.....	33

4- Cinétique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose.....	34
5- Effet de la cellulose sur l'hydrolyse enzymatique.....	35
6- Effet de la lignine sur l'hydrolyse enzymatique.....	35

III- PARTIE EXPERIMENTALE:

CHAPITRE I: Détermination des principales caractéristiques

du substrat:

1- Introduction.....	37
2- Matériels et méthodes.....	37
2.1- Origine des échantillons.....	37
2.2- Préparation du substrat.....	37
3- Résultat.....	40
4- Discussion	41
5- Conclusion.....	42

CHAPITRE II: Prétraitement chimique:

1- Introduction.....	43
2- Effet des paramètres physico-chimiques.....	43
3- Influence du prétraitement à la soude caustique sur la composition chimique du substrat.....	43
3.1- Mode opératoire.....	43
3.2- Résultats.....	44
3.3- discussion.....	44
4- Efficacité du prétraitement à la soude caustique.....	45
4.1- Mode opératoire.....	45
4.2- Résultat.....	45
4.3- Discussion.....	46
5- Conclusion.....	46

CHAPITRE III: Hydrolyse enzymatique

1- Introduction.....	47
2- Etude de la cinétique enzymatique en fonction de la concentration d'enzyme.....	47
2.1- Mode opératoire.....	47
2.2- Résultats.....	49
2.3- Discussion.....	54
3- Etude de la cinétique enzymatique en fonction de la concentration de substrat.....	54
3.1- Mode opératoire.....	54
3.2- Résultats.....	55
3.3- Discussion.....	67
4- Conclusion.....	67

IV CONCLUSION GENERALE..... 68

<u>ANNEXE</u>	70
Annexe 1.....	70
Annexe 2.....	71
Annexe 3.....	72
Annexe 4.....	73

BIBLIOGRAPHIE..... 74

Introduction

L'agriculture et l'exploitation des forêts présentent une réserve de sucres fermentescibles. Cependant, des sous-produits ligno-cellulosiques non utilisés sont disponibles en grande quantité.

La cellulose peut être valorisée en tant que polymère dans l'industrie des dérivés de la cellulose ou bien, après hydrolyse par voie chimique ou enzymatique, fournir du glucose qui constitue une matière première importante pour l'industrie chimique.

Les produits ligno-cellulosiques constituent également une ressource énergétique renouvelable qui peut être utilisée par combustion directe, mais également par fermentation de la fraction glucosidique en éthanol.

L'extraction de l'huile d'olive laisse un résidu abondant et peu utilisé en alimentation animale. Selon NEFZAOU (1985), celui-ci représente environ 80 % de poids des fruits traités. L'objectif serait alors de pouvoir tirer profit de l'énergie brute que renferme ce résidu. En effet, cette dernière est estimée par MELINI (1990) à 4700 Kcal / Kg de matière sèche dont près de 50 % au niveau de la membrane.

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

ABERKAN (1990), rapporté que les sous-produits oléicoles 51 millions de tonnes de grignon par an présentent un potentiel fourrager certain. La valorisation d'un tel potentiel s'avère intéressante. Certains travaux [6] et [22] ont été effectués à l'échelle laboratoire et même pilote permettant de valoriser cette réserve importante.

L'objectif de notre travail consiste à mettre en œuvre un procédé de valorisation d'un matériel ligno-cellulosique « le grignon d'olive » par hydrolyse enzymatique à l'échelle laboratoire. En effet notre travail est basé sur les étapes suivantes:

- La première étape sera consacrée à une étude théorique sur l'hydrolyse des polysaccharides par les produits chimiques (acides et bases) et biologiques (enzymes).
- La deuxième étape est consacrée à l'effet du prétraitement des grignons d'olives à la soude caustique sur le rendement de saccharification.
- La troisième partie consiste à une étude de la cinétique d'hydrolyse du résidu ligno-cellulosique « le grignon d'olive ».

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I



**IMPORTANCE DE LA PRODUCTION OLEICOLE
ET
DES SOUS-PRODUITS DE L'OLIVIER**

1- La production oléicole:

Bien que la production de l'olivier soit répartie sur les cinq continents elle est surtout prédominante dans la zone du bassin méditerranéen qui représente 98% de la surface totale emblavée et des arbres en production et 97% de la production totale d'olives.

Quatre pays (Espagne, Grèce, Italie, Tunisie) représentent à eux seuls 65% de la surface occupée par les oliviers, 78% des arbres en production et 74% de la production totale d'olives (tableau 1).

Pays	Arbres * 10 ³	%	surface en ha*10 ³	%	Densité Arbre / ha
Algérie	15.818	2.0	204	2.2	80
Espagne	207.726	26.6	2.415	26.9	86
France	5.766	---	42	---	137
Maroc	28.000	3.6	150	2.7	112
Tunisie	52.936	6.8	1363	15.1	39
USA	4.500	---	44	---	102
Argentine	8.270	1.0	84	0.9	92
Syrie	19.315	2.5	146	1.6	132
Grèce	95.936	12.3	504	5.6	190

Tableau (1): Répartition des oliviers par pays [6].

2- L'oléiculture et l'industrie oléicole en Algérie:

2.1- Situation actuelle de l'oléiculture:

L'Algérie, comme tous les pays méditerranéens, offre à l'olivier un milieu très favorable. La culture de l'olivier est l'une des plus importantes de toutes les cultures arborescentes. Elle couvre environ 204.000 Ha soit 45 % de la surface totale occupée par les arbres fruitiers [1].

L'olivier est présent sur toute la région tellienne et s'étend jusqu'aux Oasis du Nord-Saharien, avec des concentrations variables.

Les plantations oléicoles ne cessent de se développer notamment dans les wilayas de Tizi-Ouzou, Mostaganeme, Annaba et Setif. La structure de ces plantations d'olivier est la suivante:

- 40% de jeunes arbres
- 40% d'arbres adultes
- 20% d'arbres vieux ou sénescents.

Le tableau (2) montre que 56% de la superficie oléicole sont concentrés dans le centre du pays.

Les oliviers à l'huile représentent 95% de la production totale d'olives. Les variétés rencontrées sont principalement : La Chemlal (50%), l'Azeradg (5%), la Bouchouk et la Limli (2%) cultivées surtout en Kabylie et la Sigoise (20%) à l'Oranie. A côté de ces variétés locales, on rencontre aussi des variétés introduites d'Espagne, de France et d'Italie comme la Cornicobra, la Lucques et la Frantoïo [6].

3- Composition de l'olive:

L'olive est une drupe, sa composition physique est indiquée à la figure (1) [2].

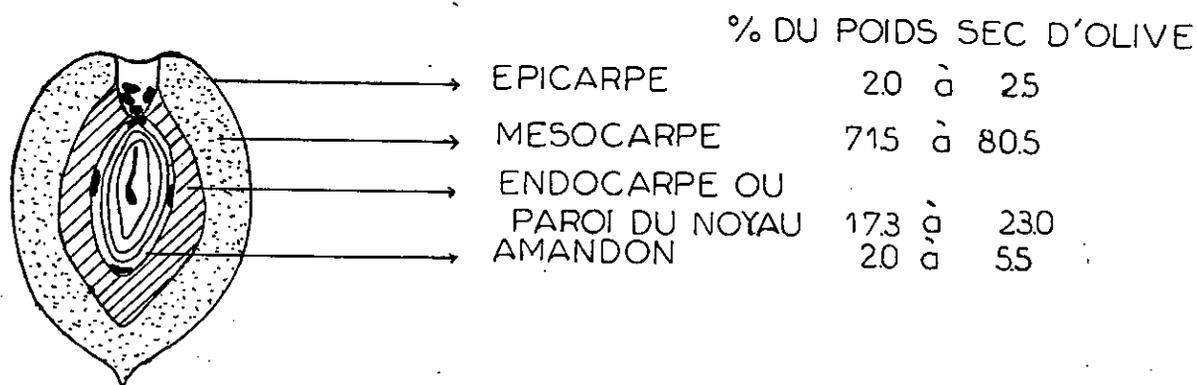


Figure (1): Composition physique de l'olive [2].

La composition chimique de l'olive est fonction de plusieurs paramètres, dont la variété, le climat et les conditions culturales. La composition chimique moyenne de l'olive en fonction des différentes parties anatomiques est indiquée dans le tableau (3).

Région	surface (Ha)	trituration des olives à l'huile			huile	grignon	répartition par système d'extraction		
		offices privés totale			(T)	(T)	centrifugation super-presse classique		
Ouest	29000	1800	---	3000	6000	2500	2500	15500	---
Centre	114000	7000	72000	10300	26000	1000	1000	13000	65000
Est	61000	7000	6000	1700	4000	---	---	8000	5000
Total	204000	32000	78000	11000	15000	36000	35000	36500	70000
		29%	71%				3%	33%	64%

Tableau (2) : répartition des plantations, de la production et trituration des olives à huile (RAMOS et al, 1982).

Partie anatomique constituant	Epicarpe	Mésocarpe	Endocarpe + Armandon
Cendres totales	1.6	2.3	1.2
Matières azotées	9.8	9.6	1.3
Matières grasses	3.4	51.8	0.8
Cellulose brute	2.4	12.0	74.1
Extractifs non azoté	82.8	24.0	22.7

Tableau (3) : Composition chimique de l'olive mure [4].

4- Définition des sous-produits de l'oléiculture:

La technologie d'extraction de l'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 extraction de l'huile. Une multitude de sous-produits en résulte.

On distingue:

- Le grignon brut: est le résidu de la première extraction de l'huile par pression de l'olive entière: ses teneurs élevées en eau (2.4 %) et en huile (9 %) favorisent son altération rapide lorsqu'il est laissé à l'air libre.

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

- Le grignon tamisé: ou partiellement dénoyauté): il résulte de la séparation partielle des débris de coque du noyau et de la pulpe par tamisage ou ventilation.

Il est dit « gras » si son huile n'est pas extraite par solvant et « dégraissé » ou « épuisé » si son huile est extraite par solvant.

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

- Les margines: forment le résidu aqueux séparé de l'huile par centrifugation ou sédimentation après le pressage.

Les quantités produites de ces sous-produits varient selon le procédé d'obtention de l'huile.

- Les eaux de végétation: contiennent en moyenne 1.8 % de substances minérales et 15 % de substances organiques, ces dernières étant composées particulièrement de sucre (2% à 12%), de substances azotées, d'acides organiques, de polyalcools, etc.

5- La composition chimique du grignon d'olive:

La composition chimique des grignons d'olive varie dans de très larges limites, selon le stade de maturité, le procédé d'extraction de l'huile, l'épuisement (Pilla 1969).

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 du sous-produit (presse, centrifugation, épuisement aux solvant, etc....). Cependant, on peut retenir les données générales suivantes:

1- Teneur en matière sèche:

Elle varie selon le type de grignon DEMAY (1956) cité par ABDOULI (1978) signale que la presse hydraulique et la super presse laissent un grignon à 25 % d'humidité contre 60 % pour la presse en continue. Des variations sensibles sont également observées, dans une même usine (NEFZAOU, 1978).

2- Les matières minérales:

Des teneurs en cendres 4 à 5 fois plus importantes que celles considérées comme une moyenne (5 % de M.S) sont rapportées par certains auteurs. Cet excès est attribué à une contamination par du sable au niveau des huileries.

Le potassium et le calcium apparaissent comme les éléments prédominants, suivis du phosphore et sodium.

3- Les matières grasses:

La teneur en matières grasses est le plus souvent élevée et demeure fonction du mode d'extraction de l'huile.

La pression donne des grignons et pulpes riches en M.G (30 % de la M.S en moyenne). L'épuisement par solvants la réduit à 4 - 5 % de la M.S. Ce qui explique l'intérêt de cette opération.

La matière grasse du grignon d'olive est riche en acide caprylique, caproïde, oléique et linoléique. Les proportions en chacun de ces acides gras diffèrent en fonction de l'origine des olives et du traitement appliqué .

La richesse du grignon en lipides pose un problème de conservation de ce résidu.

4- Les fibres brutes:

La teneur en cellulose brute est également élevée et varie de 15% à 50% de la MS. Elle dépend de la proportion de coques présente dans le résidu. Les coques de noyaux renferment 74% de fibres brutes contre 2.43% et 12.01% respectivement pour la pellicule et la pulpe (ABDOULI, 1979). La composition des membranes cellulaires renferme une forte teneur en lignine (30% de la M.S).

5- Les matières azotées totales:

La teneur en protéines brutes est voisine de 10 % de la M.S et varie (7 à 16 %) en fonction de la proportion de coques de noyaux. Ces derniers représentent environ la moitié de la masse du grignon et renferment 1 à 2% de M.A.T (THERIEZ et BOULE 1970 - ABDOULI, 1979). Ainsi contrairement aux autres tourteaux, le grignon d'olive est pauvre en protéines brutes.

6- Les composés phénoliques:

VASQUEZ RONCERO (1974) a identifié dans la pulpe d'olive les polyphénols suivants: oleuropeine- caffeul-glucose (ester d'acide caféique). L'acide coumarique est le flavanol. Ce même auteur (1965) rapporte la présence de quelques composés phénoliques de type simple

gugenol, catechine et pyrocatechine. (NEFZAOU, 1978) RAPPORTE UNE TENEUR EN TANINS DE 0.63% de produit brut pour un grignon tamisé et séché contre 0.52% pour le même résidu mais épuisé à l'hexane.

Les teneurs moyennes des différents types de grignons en cendres totales (CT), en matières grasses (M.G), en cellulose brute (CB), et en extractif non azoté (ENA) sont représentés dans le tableau (4).

Type de grignons	Brut	Epuisé	Tamisé	Epuisé-Tamisé
M.S	81.4	89.0	92.8	89.5
O.T	8.0	7.9	17.3	15.5
M.A.T	6.6	13.6	7.3	10.3
M.G	12.9	3.2	18	4.0
CB	35.5	40.7	24.2	21.5
ENA	37.0	34.6	33.2	48.7

Tableau (4) : Composition chimique des différents types de grignon en % de la M.S [4].

6- Estimation quantitative des rejets d'huilerie et impact sur l'environnement:

Le grignon se compose de la pellicule du fruit (épicarpe), et de l'amondon (graine).

Le rendement en grignon varie, selon les auteurs entre 33 % et 45 %. Ainsi, la trituration de 100 Kg d'olives donne 33 à 45 Kg de grignon à 70 - 80 % de M.S, 20 Kg d'huile, 40 Kg de margarines [14].

La production de grignons varie d'une année à une autre en fonction de la production d'olives à huile.

Dans la région de la Kabylie, la principale région productrice de l'huile en Algérie, les rejets solides et liquides des huileries sont estimés en tonnage et en volume à 48.000 tonnes de grignons et 48.000 m³ d'eau de végétation (margines) rejetés directement dans la nature, ces produits occasionnent de graves détériorations à l'environnement. En effet, les eaux de végétation et par simple infiltration contaminent les eaux souterraines. Elles peuvent également former des cours d'eau contenant une forte charge polluante, qui rendent difficile le développement de la faune et de la flore[2].

7- Valorisation des sous-produits de l'oléiculture:

Les grignons d'olives, les coques et les eaux de végétation, pour leurs quantités très importantes, et leurs effets défavorables sur l'environnement, ont fait l'objet de valorisation, afin d'être utilisés à des fins industriels. (schéma 1).

1- Valorisation des coques:

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

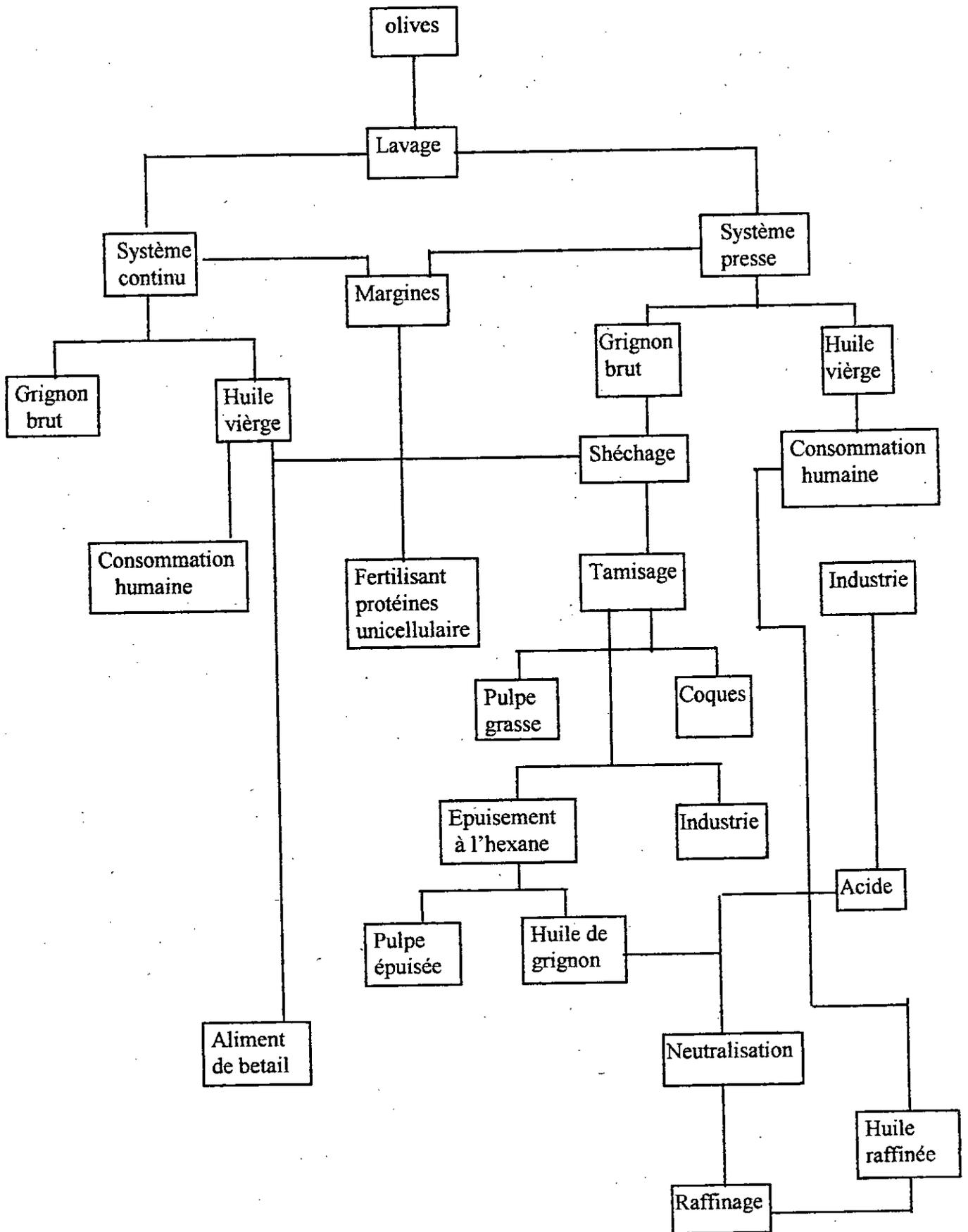
2- Valorisation des grignons:

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

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

3- Valorisation des eaux de végétation:

L'étude des méthodes visant à l'utilisation industrielle des eaux de végétation qui en prévoit aussi la séparation, apparaît assez souhaitable. Outre leur emploi comme engrais liquide, fertilisant et compost, on a découvert en Espagne, une méthode intéressante qui consiste à exploiter les eaux de végétation en extrayant des levures de type " candidas " qui permettent l'épuration des eaux. La teneur en sucre, facilement assimilable des eaux de végétation, les sels minéraux et un pH excellent en font un champ idéal pour le développement de ces levures [8], [14].



Shémas (1) : Valorisation des produits de l'olive [12]

CHAPITRE II



LES RESIDUS LIGNO-CELLULOSIQUES

La plus grande partie du carbone organique produit par la photosynthèse se présente sous forme de polymères de la paroi cellulaire de végétaux, à savoir: cellulose, hémicellulose et lignine. L'agriculture et l'exploitation des forêts représentent une utilisation importante de cette ressource. Chimiquement, les parois végétales comprennent trois constituants principaux: la cellulose, les hémicelluloses et la lignine.

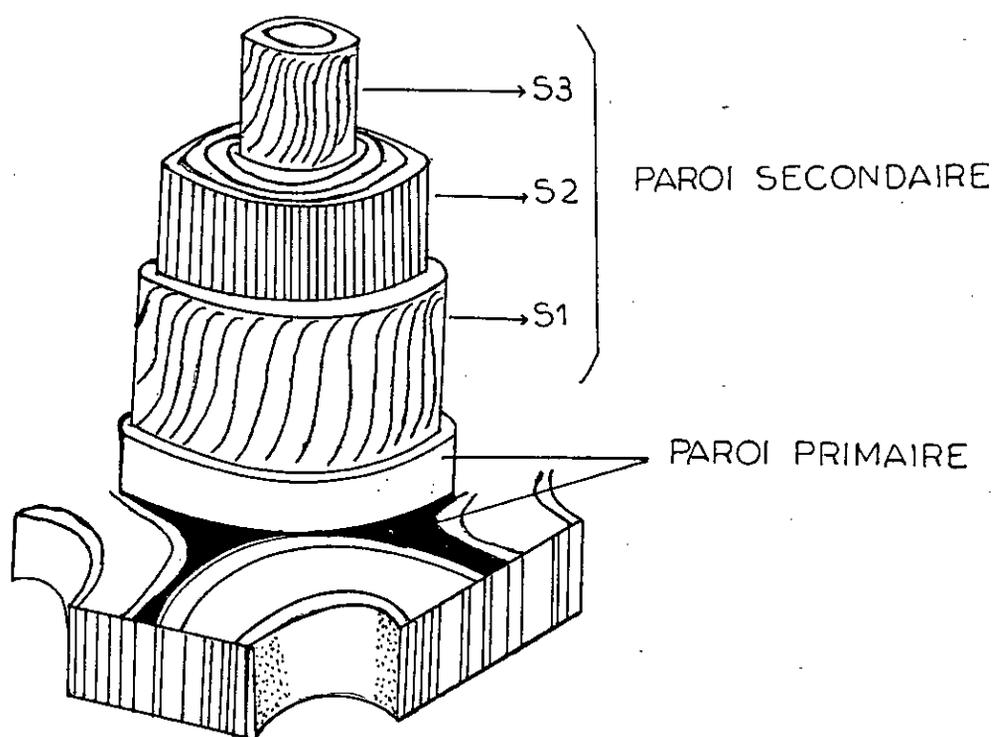


Figure (2): Structure de la paroi végétale [4]:

1- La cellulose:

C'est un polysaccharide fibrillaire, forme le matériel structural de base des parois cellulaires. Sa structure fibreuse assure une certaine rigidité aux parois cellulaires. la cellulose est un homopolysaccharide d'unités glucose liées en $\beta - (1 \longrightarrow 4)$ dont le degré de polymérisation varie suivant les sources, de quelques centaines à quelques dizaines de milliers. On considère généralement que la molécule de cellulose de bois est constituée d'environ 10.000 résidus glucosidiques donnant un poids moléculaire de 1.5 million pour une longueur proche de 5 μm .

Les chaînes de cellulose sont associés ensemble par des liaisons hydrogène formant des structures d'ordre supérieur, ordonnées de façon cristalline. Pour certains auteurs, l'unité cristalline

est représentée par un cristal monocyclique contenant deux unités cellobiose (4 - 0 - β - D - glucopyranosyl - D - glucose) de deux chaînes de cellulose antiparallèles.

Pour d'autres, dans la cellulose native, les chaînes sont parallèles ne seraient liées entre elles que par des forces de type Vander Weals.

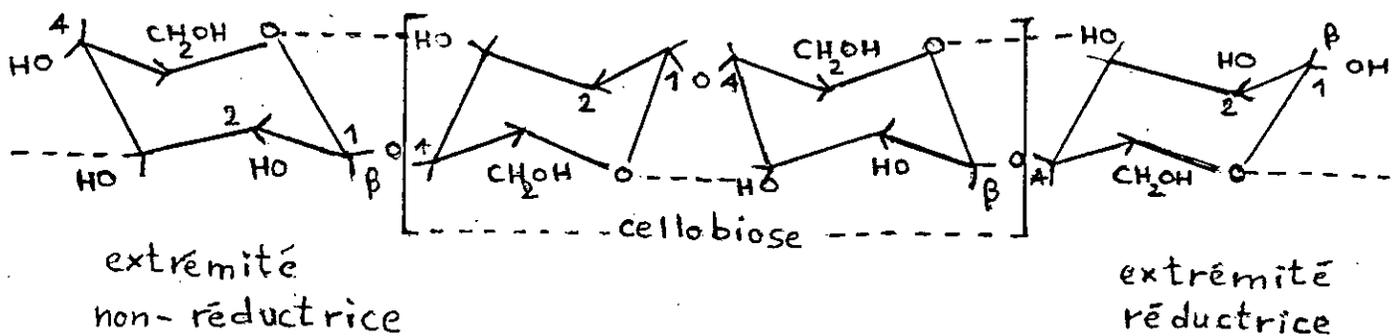


Figure (3) : Structure chimique d'une molécule de cellulose [4].

La cellule peut être valorisée en tant que polymère dans l'industrie des dérivés de la cellulose ou bien, après hydrolyse par voie chimique ou enzymatique, fournir du glucose qui constitue une matière première importante pour l'industrie chimique.

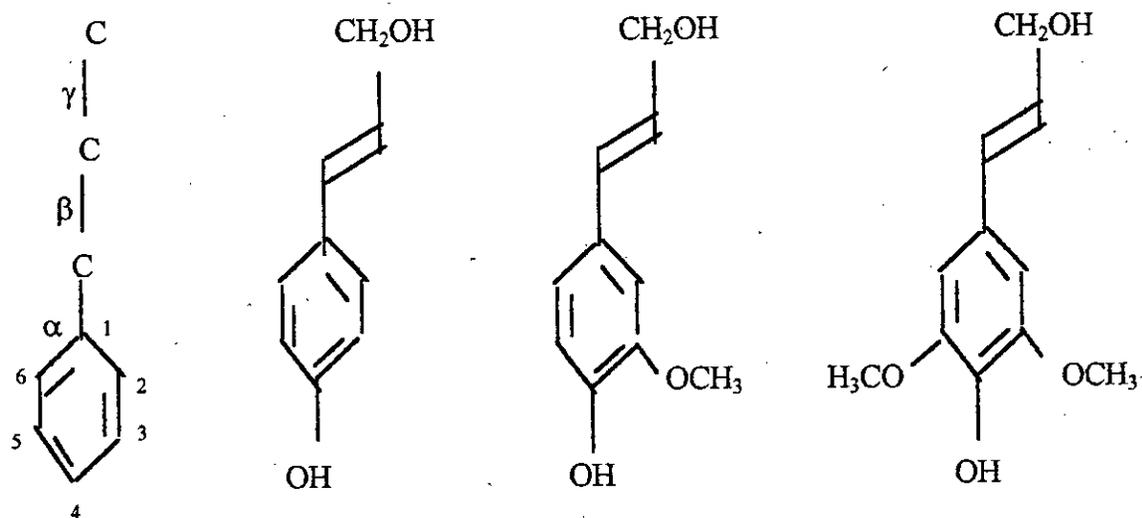
La cellulose est essentiellement insoluble dans l'eau mais soluble dans la liqueur de Schweitzer [3].

2- Les hémicelluloses:

Cette classe de polysaccharides est surtout représentative de la paroi secondaire des végétaux. Ce sont des polyholosides complexes fournissant par hydrolyse un mélange de pentose, d'hexoses et d'acides uroniques. Cependant des polysaccharides hémicellulosiques mineurs sont des constituants des parois primaires. Les hémicelluloses sont associés à la cellulose par des liaisons hydrogène solubilisés par les bases diluées (soude, potasse).

3- La lignine:

La lignine n'est pas un glucide mais un copolymère très complexe de trois alcools à noyau aromatique phenylpropane (Harkin, 1973 et Monties 1980). Elle est définie comme étant une substance amorphe qui incruste les fibres polysaccharides des tissus de soutien et de conduction, accroissant ainsi leur rigidité (Jarrige, 1981). Ces incrustations de lignine rendent certains polysaccharides moins accessibles aux enzymes.



- (1) l'alcool p- coumarylique (alcool trans - 4 - hydroxycinnamylique)
- (2) l'alcool coniférylique (alcool trans - 4 - hydroxy - 3 - méthoxycinnamylique)
- (3) l'alcool sinapylique (alcool trans - 4 - hydroxy - 3.5 - dimethoxy - cinnamylique)

Figure (4): Structure de la lignine [2].

CHAPITRE III



LES ENZYMES

1- Définition:

Les enzymes sont des catalyseurs d'une efficacité et d'une spécificité fonctionnelle remarquables. Elles interviennent dans tous les processus de biosynthèse, de dégradation, de régulation et de reproduction. Les catalyseurs enzymatiques sont toujours des macromolécules protéiques associées éventuellement à des cofacteurs de petite taille.

2- Nature des enzymes:

Ce sont toutes des macromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaires. Certaines sont des holoprotéines constituées uniquement d'un enchaînement d'acides aminés; d'autres sont des hétéroprotéines possédant une partie non protéique, le cofacteur, nécessaire à l'activité catalytique et lié plus ou moins fortement à la protéine.

3- Spécificité de la catalyse enzymatique: le site actif:

Un des caractères les plus importants de la catalyse enzymatique réside dans sa spécificité beaucoup plus marquée que celle de la catalyse chimique.

Cette spécificité présente un double aspect:

- *Spécificité réactionnelle:* une enzyme ne peut catalyser qu'un type de réaction donné. Cette spécificité sert de base à la classification de ces catalyseurs biochimiques.
- *Spécificité quant au substrat:* cette propriété résulte du fait que toute réaction enzymatique implique la fixation du substrat en des points bien précis de la protéine enzymatique.

4- Nomenclature et classification des enzymes:

La nomenclature et la classification des enzymes ont été normalisées par la commission sur les enzymes de l'union Internationale de Biochimie.

La règle générale adaptée pour désigner une enzyme en nomenclature systématique est que le nom d'une enzyme doit être formé de deux parties:

- la première comporte le nom du substrat.
- la seconde partie indique la classe à laquelle appartient l'enzyme.

Les enzymes sont classées officiellement en six groupes:

1- Les oxydoréductases: Elles catalysent les réactions d'oxydo-réduction.

2- Les transférases: Elles catalysent des réactions de transfert de radicaux fonctionnels d'une molécule à l'autre.

3- Les hydrolases: Elles provoquent l'hydrolyse de divers types de liaisons: ester, acétal, amide, etc. C'est la classe qui contient la plupart des enzymes utilisées en industrie.

4- Les lyases: Elles rompent les liaisons C-C, C-O, C-N, ou autres par des moyens différents de l'hydrolyse ou de l'oxydation, avec réaction d'une double liaison sur l'un des deux fragments.

5- Les isomérases: Elles catalysent les réactions d'isomérisation.

6- Les liqases: Ce sont des enzymes catalysant la réaction d'union de deux molécules, couplée avec la rupture, sans intervention d'eau, d'une liaison phosphorique dans l'ATP.

5- Les cellulases: Les premières études sur la dégradation de la cellulose, par des organismes variés, remontent au début du siècle. Dans les années 1930, la dégradation enzymatique requérant deux types d'enzymes dont l'une aurait une affinité pour les longues chaînes de β - glucanes (cellulose sensu stricto) et l'autre pour les chaînes courtes (cellobiase).

Parmi les champignons cellulolytiques, on trouve différentes réponses au problème de l'hydrolyse de la cellulose.

Essentiellement, deux types de mécanismes sont mis en jeu:

Celui utilisé par les champignons de pourriture blanche et certaines moisissures (ascomycètes et Deuteromycètes), et celui utilisé par les champignons de pourriture brune.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'enzyme cellulolytique sécrétée par le champignon de pourriture blanche: se sont des agents de pourritures du bois qui peuvent dégrader simultanément la cellulose, les hémicelluloses et les lignines. Il s'agit principalement de basidiomycètes mais aussi d'Ascomycètes. (" le trichoderma-reesei ").

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

Les principales sources de cellulases sont représentées dans le tableau (5).

Fungi	Bactérie
Trichoderma viride	Micromonospora ruminantium
Trichoderma koningii	Ruminococcus albus
Trichoderma reesei	Ruminococcus flave facieus
Chaetonium indicium	Bactériode ruminantium
Chaetonium cellulotium	Clostridium cellobiomorus
Murothecium verrucaria	Clostridium thermocellulassium
Aspergillus niger	Bacillus subtilus
Rhizopus stolonifer	Arthrobacter luteus
Sporotrichum thermophile	Micro polyspora
Sporotrichum pulverichentum	Clostridium thermocellum
Penecillium rubrum	Cellulomonas U.D.A
Penecillium janthinellum	Cellvibrio fulvus
Polyponus versicolor	Cellabrio gibvus
Basidiomycetes opécies	Sporocytophaga mycoccoides
Helmuntos poinum cylops	Actinomyces sp
Fusarium solani	Proactinomyces sp
Fusarium oxysporum	Nocardia sp.
Stachybotys actra	
Talaromyces emersoniu	
Schizophylum commune	
Thermonospora curvata	

Tableau (5) : Les micro - organismes sources importantes de cellulases.

Ce champignon est cultivé dans un milieu de culture où le lactose représente la principale source de carbone.

La présence des agents tensioactifs dans ce milieu facilite la synthèse des cellulases. Les surnageants de culture de tels champignons contiennent des endoglucanases, des exo-glucanases et des β - gluconisades [3].

CHAPITRE IV



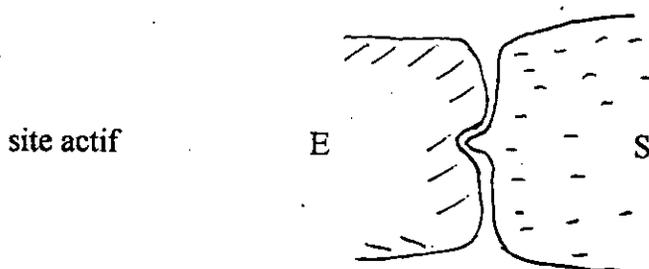
CINETIQUE ENZYMATIQUE

L'objet de la cinétique enzymatique est l'étude des enzymes dans leur fonctionnement. Elle se propose en particulier, d'établir les réactions qui existent entre la vitesse de la réaction enzymatique et les concentrations en substrat [S] et enzyme [E] ainsi que l'influence de certains facteurs: pH, température, présence d'effecteurs, etc [24].

1- Théorie de Michaelis et Menten:

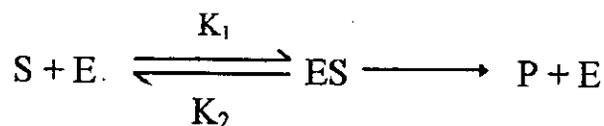
La cinétique enzymatique, selon Michaelis et Menten, est basée sur 3 hypothèses qui ont été vérifiées expérimentalement:

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



- ◆ Le complexe formé entre l'enzyme et le substrat est réversible.
- ◆ La vitesse de la réaction enzymatique, c'est à dire la quantité de produits formés par unité de temps, est proportionnelle à la concentration du complexe [ES].

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



E: enzyme

S: substrat

ES: complexe enzyme - substrat

P: produit de la réaction enzymatique

K_1, K_2, K_3 : constante de vitesse

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

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

avec V_{\max} : vitesse maximale

K_m : constante de Michaelis.

Le tracé de la courbe $V = f([S])$ est représenté sur la figure (5).

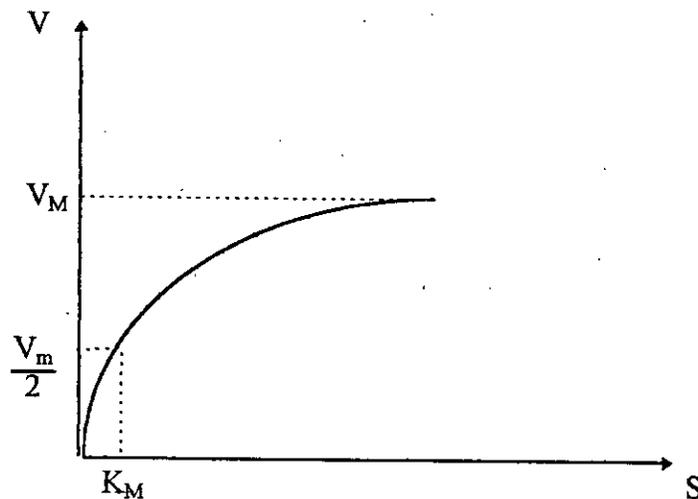


Figure (5): Représentation de $V = f([S])$

2- Activité de l'enzyme:

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

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

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

3- Constante de Michaelis " Km "

Dans l'équation de Michaelis, K_m est la quantité de substrat qui dans le milieu, permet à l'enzyme de procéder à la vitesse $\frac{V_{max}}{2}$. Elle est en fait la constante d'affinité.

K_m est exprimé, en concentration de substrat (mole / l) [7].

4- Détermination des paramètres Km et Vmax:

La vitesse maximale V_{max} et la constante de Michaelis K_m sont extrapolées, à partir des transformations suivantes de l'équation de Michaelis (figure 5).

Représentation de Eadie:

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

Représentation de line Weaver et burk:

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

Représentation de Woolf:

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

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

En effet:

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

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

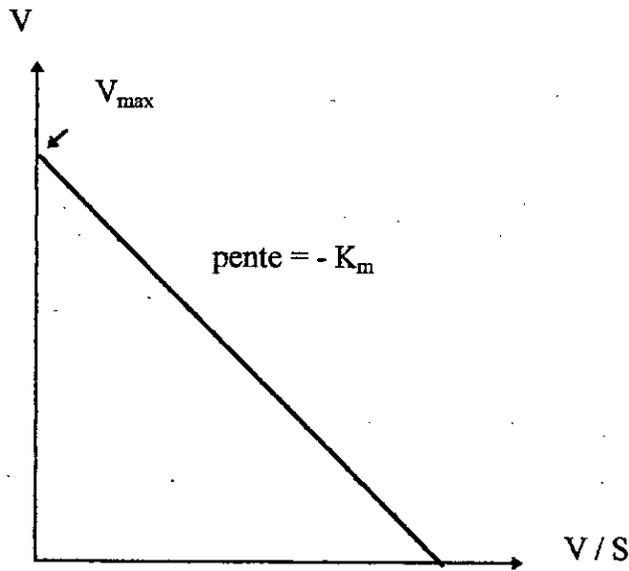
avec $y = \frac{1}{V}$ et $x = \frac{1}{[S]}$

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

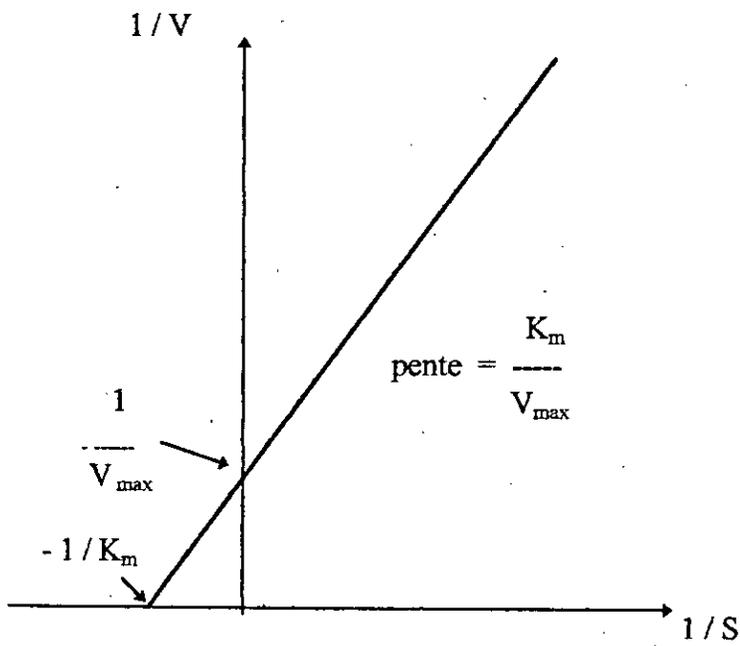
pour

pour $\frac{1}{V} = 0$ on a $\frac{1}{[S]} = - \frac{1}{K_m}$

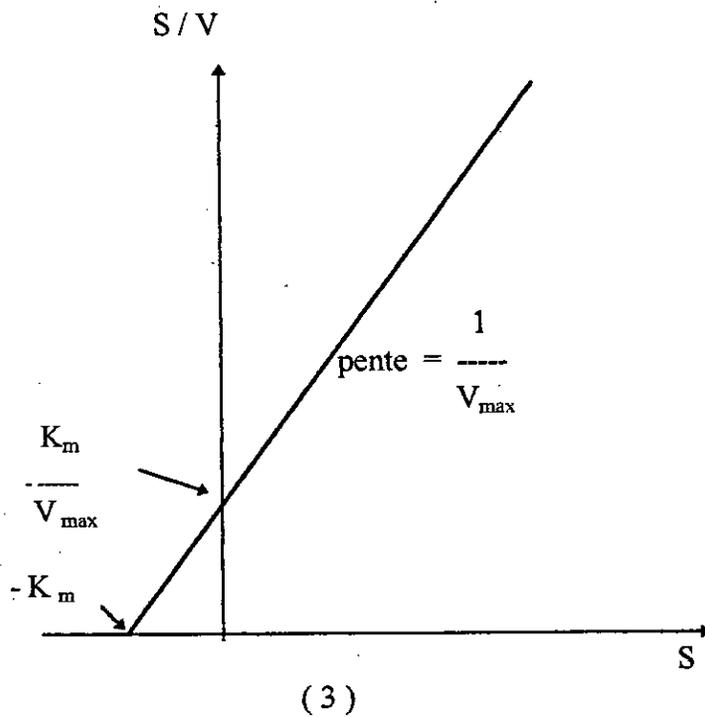
il devient alors aisé de déterminer graphiquement $\frac{1}{V}$ et $\frac{1}{K_m}$ en outre, la pente de la droite est $\frac{K_m}{V_{max}}$ [2], [9] figure (6).



(1)



(2)



- (1) : Représentation de Eadie
- (2) : Représentation de Line Weaver
- (3) : Représentation de Woolf.

Figure (6)

5- Variation de P = f (t):

Dans les conditions expérimentales définies de concentration en substrat et en enzyme, de température et de pH, le suivi de la réaction, enzymatique est possible par le dosage régulier du produit P formé. On obtient la courbe de la figure 7.

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

6- Variation de $V = f(E)$:

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

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

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

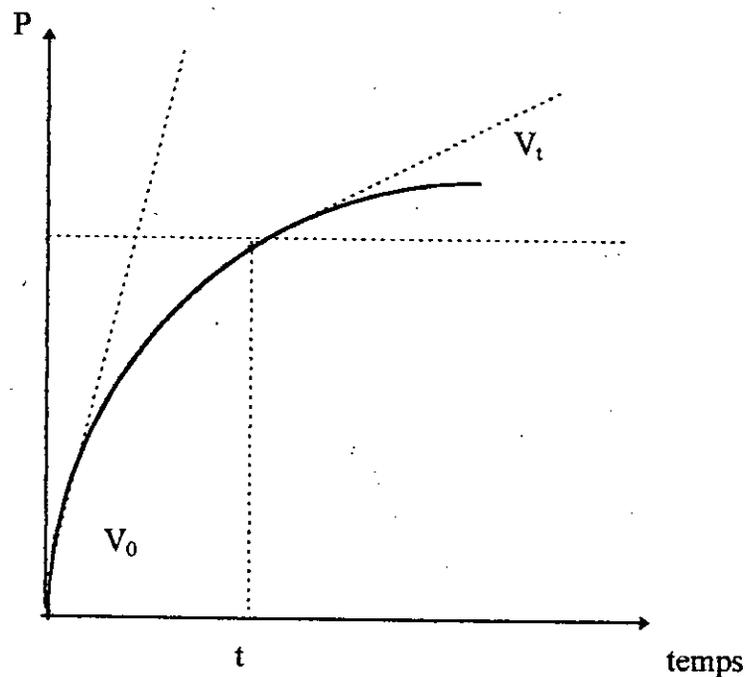


Figure (7) : vitesse d'une réaction enzymatique [9].

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

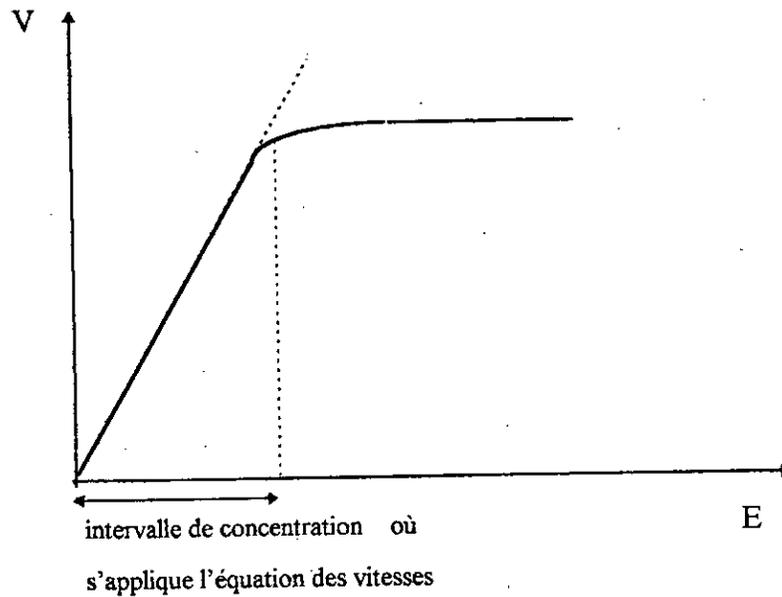


Figure (8) : Loi de variation de la vitesse avec la concentration d'enzyme [16].

7- Facteurs physiques et physico-chimiques affectant la réaction enzymatique:

7.1- La température:

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

Sa valeur dépend de la durée, de la réaction enzymatique [5].

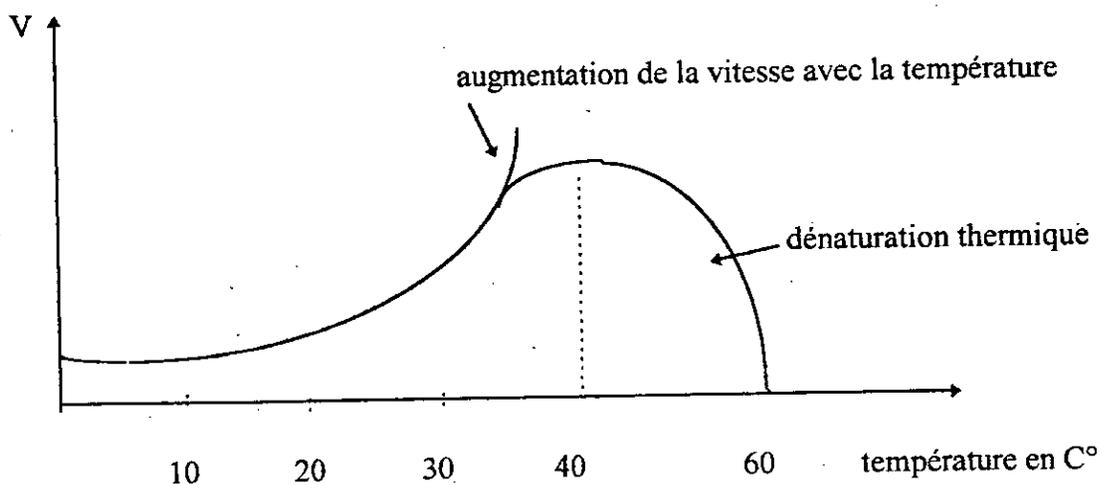


Figure (9) : variation de la vitesse d'une réaction enzymatique avec la température.

7.2- Action du pH

L'activité d'une enzyme varie avec le pH, l'étude des variations de l'activité enzymatique en fonction du pH permet de constater l'existence de deux pH limites au delà desquels l'action est nulle. Entre ces deux pH, l'activité présente un maximum à un pH bien définie, dans ces conditions particulières, dit pH optimal: figure (10)

La valeur du pH optimal dépend de la nature du substrat et de l'enzyme ainsi que de leurs concentration [24].

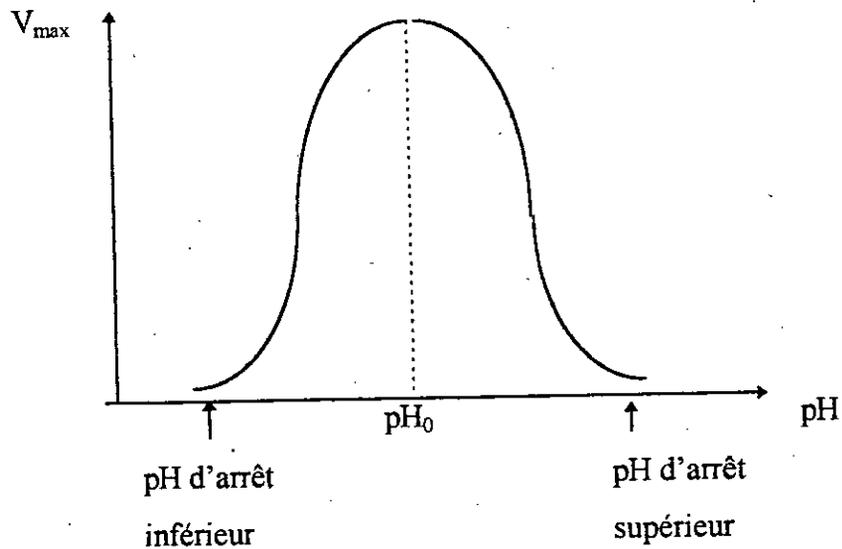


Figure (10) : courbe de variation de l'action d'une enzyme en fonction du pH [9].

8- Effecteurs d'enzymes: les inhibiteur :

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

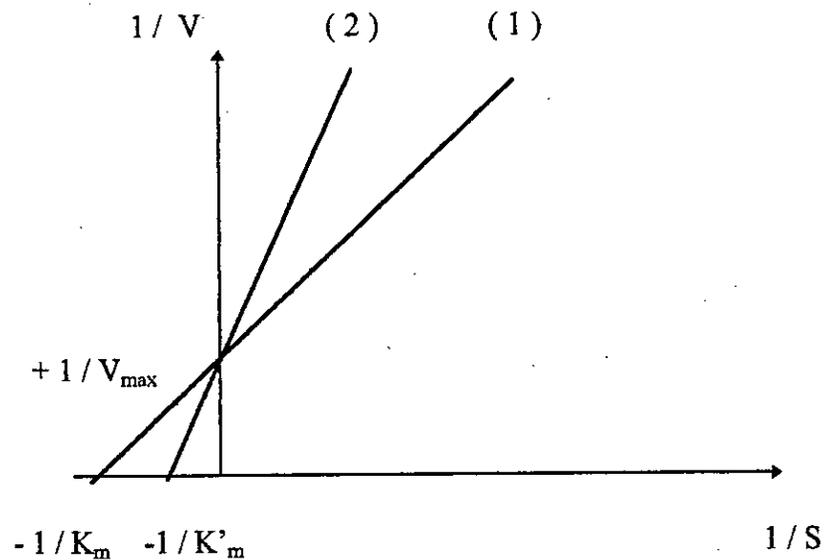
8.1- Inhibition compétitive: (figure 11)

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

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

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

K_i : constante d'inhibition



(1) : sans inhibition $[i] = 0$

(2) : avec inhibition à la concentration $[i]$

Figure (11) : Représentation selon Line Weaver et Burk d'une inhibition compétitive.

8.2- Inhibition non compétitive:(figure 12)

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

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

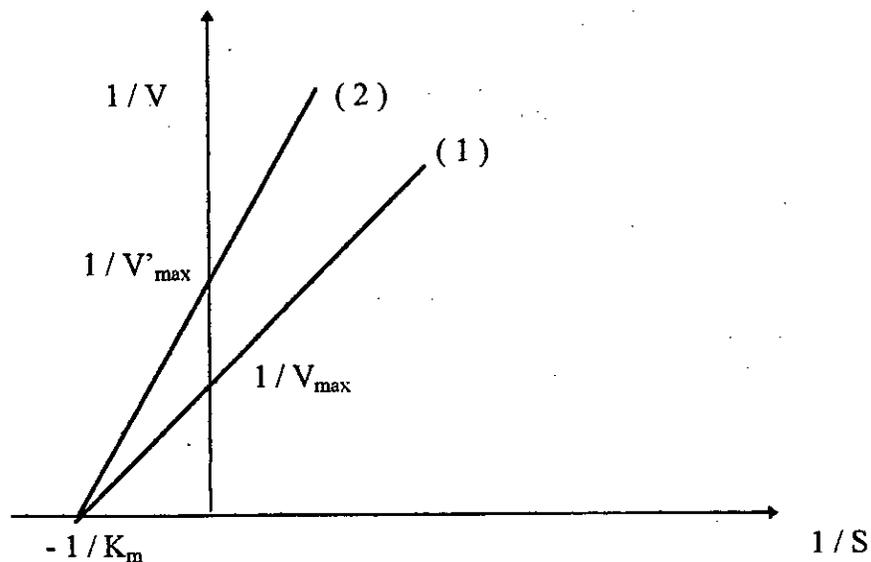
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{S} \left[\frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{[I]}{V_{\max}} \cdot \frac{K_m}{K_I} \right] + \frac{1}{V_{\max}} \cdot \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]$$

8.3- Inhibition incompétitive: (figure 13)

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

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

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



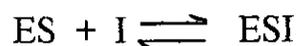
(1) : sans inhibiteur [I] = 0

(2) : avec inhibiteur à la concentration [I] :

Figure (12) : Représentation selon Line Weaver et Burk d'une inhibition non compétitive.

8.4- Inhibition par le substrat : figure (14)

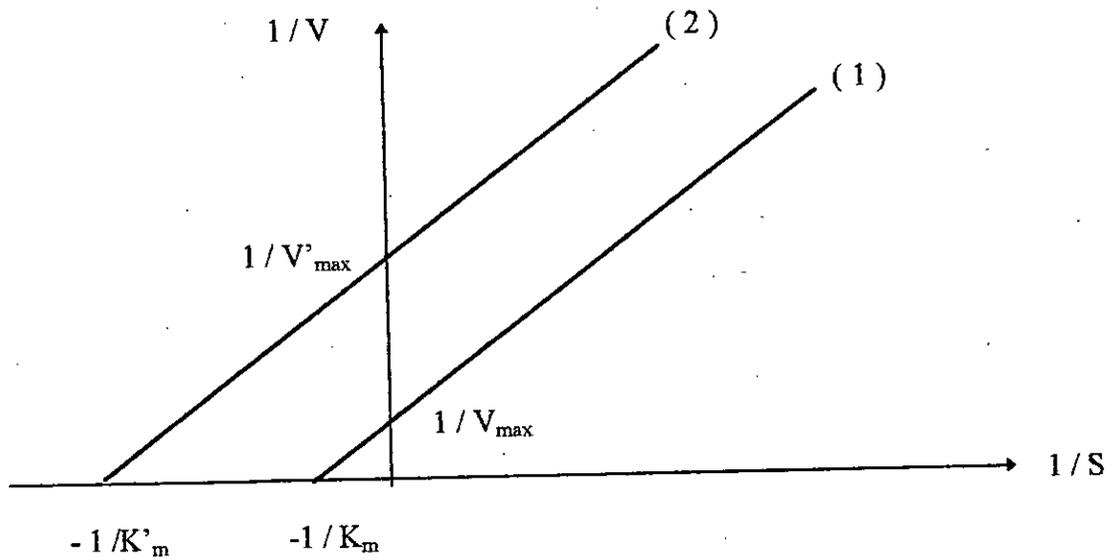
Les réactions régissant le phénomène sont les suivantes



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

Elle est déterminée par la réaction suivante:

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



(1) : sans inhibiteur [I] = 0

(2) : avec inhibiteur à la concentration [I].

Figure (13) : Représentation selon LineWeaver et Burk d'une inhibition incompétitive.

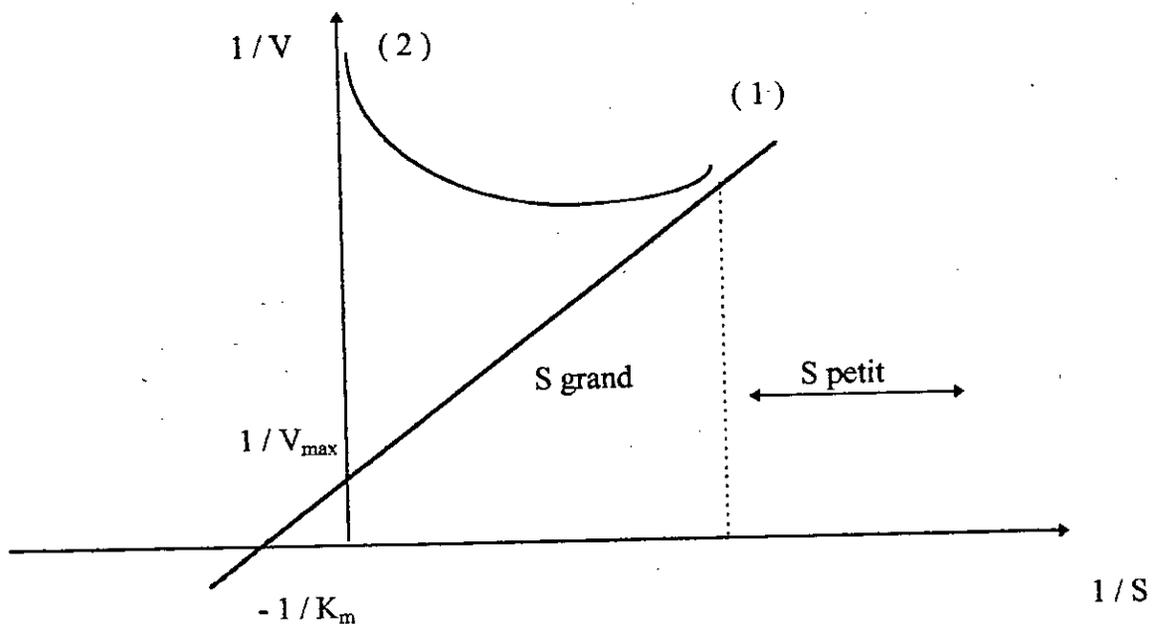


Figure (14) : Représentation selon Line Weaver et Burk d'une inhibition par le substrat [5],

[9].

CHAPITRE V



LES PRETRAITEMENTS

Les constituants de la biomasse lignocellulosique (ex: la lignine) peuvent empêcher la dégradation complète des celluloses et hémicelluloses. Tous ces composants polymères sont physiquement entrelacés, chimiquement liés et donc parfois peu accessibles aux enzymes (CRAWFORD R.L, 1981; SARKANEN K.V et al, 1971).

Dés lors, dans les procédés de valorisation, la biomasse lignocellulosique subit d'abord des prétraitements physico-chimiques et microbiens destinés à améliorer son inaptitude à l'hydrolyse enzymatique.

Les prétraitements et selon leurs mode d'action sur le substrat sont classés en trois catégories : physiques, chimiques et biologiques [3].

1- Les prétraitements physiques:

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

1.1- Le broyage:

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

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

1.2- Pyrolyse:

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

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

Selon SHAFIZADEK, l'hydrolyse acide douce (H₂SO₄, 1N à 97 C° et pendant 2.5 h) des fractions goudroneuses produit 80 % à 85 % de sucres réducteurs.

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

1.3- Irradiation à haute énergie

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

L'irradiation de la cellulose pure aboutit à une dégradation oxydative des molécules, une déshydrogénation et une destruction des unités anhydroglucoses avec libération du dioxyde de carbone.

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

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

1.4- Prétraitement de la vapeur:

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

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

2- Les prétraitements chimiques:

Parmi les divers systèmes proposés pour atteindre un meilleur rendement de l'hydrolyse enzymatique, le plus efficace est un traitement par des alcalins en solution qui affaiblit ou détruit les liaisons entre la lignine et la cellulose.

Un tel traitement a été effectué par les grignons d'olive, des résultats favorables ont été obtenus uniquement dans le cas des grignons vierges (non extraits par solvants). Ainsi NEFZAOUI [1978], opérant sur une pulpe a démontré que par un traitement de 6 heures avec 5 % et 10 % de NaOH, la digestibilité totale in vitro augmente de 15.4 à 32.6 et 56.1 % respectivement.

2.1- Prétraitements alcalins:

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

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

2.2- Prétraitements acides:

Ce type de Prétraitement a surtout été proposé dans l'objet d'une valorisation de la cellulose en éthanol.

Il se base sur la différence de résistance à l'hydrolyse acide entre hémicellulose et cellulose.

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

Les température et durées de traitement varient suivant les techniques utilisées.

A l'issue du traitement, l'effluent liquide renferme des sucres (essentiellement des sucres en C_5) provoquant de l'hydrolyse des hémicelluloses. Le résidu solide renferme la partie cellulosique et les lignines.

Les sucres sont instables en milieu acide chaud et se dégradent en composés aldéhydriques de type furfural. Ces produits de dégradation inhibent les fermental, le choix des conditions expérimentales est donc un compromis visant la vitesse d'hydrolyse des hémicelluloses la plus élevée pour formation de produits toxiques compatibles avec une utilisation en fermentation des sucres produits [1].

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

2.3- Solvants de la cellulose:

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

3- Les prétraitements biologiques:

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

Les champignons de pourriture blanche dégradent simultanément la cellulose, les hémicelluloses et les lignines par leur complexes cellulasiques qui contiennent des endo-glucanases, des oxo-glucanases et des B-glucosidases. Il s'agit principalement de Basidiomycetes (ex : coriolus versicolor) mais aussi d'ascomycetes (ex : trichoderma-reesei).

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

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

CHAPITRE VI:



**HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES RESIDUS
LIGNO-CELLULOSIQUES**

1- Hydrolyse enzymatique:

Au cours des dix dernières années, il y'a eu de nombreuses tentatives de valorisation des rejets agricoles et forestiers. Nous citons la saccharification de la cellulose en glucose et la production de carburant par couplage d'une cellulose enzymatique et d'une fermentation microbienne.

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

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

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

2- Le système enzymatique:

Un substrat aussi complexe que la biomasse lignocellulosique ne peut être hydrolysé totalement par une seule enzyme. Le système enzymatique excrété par *Trichoderma reesei* est donc un mélange de différents enzymes coopérant entre elles.

Deux systèmes enzymatiques principaux sont présents: l'un spécifique des hémicelluloses, l'autre spécifique de la cellulose. Les enzymes spécifiques de l'hydrolyse des hémicellulose ont été beaucoup moins étudiés que les cellulases, il est généralement admis que leur mécanisme d'action est voisin de celui des celluloses, mais que leur activité spécifique leur est nettement supérieure. L'hydrolyse de la cellulose est par conséquent l'étape limitante du processus global et c'est donc le système enzymatique cellulosique que nous décrivons ci-dessous.

Ce système est composé essentiellement de trois grandes classes d'enzymes:

- Les exoglucanases: sont de deux types : cellobiohydrolases CBH = B - 1,4 glucane - 4 - cellobiodrolases) ou glucohydrolases (GH = B - 1,4 - glucane - 4 - glucohydrolases) appelées aussi exoglucosidases, qui libèrent du cellobiose ou du glucose, respectivement à partir de l'extrémité non réductrice des chaînes de B - glucanes.
- Les endoglucanases : opèrent de façon aléatoire, des coupures à l'intérieur des chaînes de cellulose et créent donc des sites d'attaque supplémentaire pour les exoglucanases.
- Les cellobiases : (B - glucosidases) hydrolysent le cellobiose, mais également le cellotriose et le cellotétraose, en glucose.

L'activité de ces enzymes est régulée par des mécanismes de rétrocontrôle : le glucose et surtout le cellobiose sont des inhibiteurs de l'activité cellobiase.

D'après MONTENECOURT et EVELEIGH, la figure (15) schématise la conception actuelle du mécanisme d'action des cellulases sur la fibrille de cellulose et la figure (16) schématise la dégradation enzymatique de la cellulose.

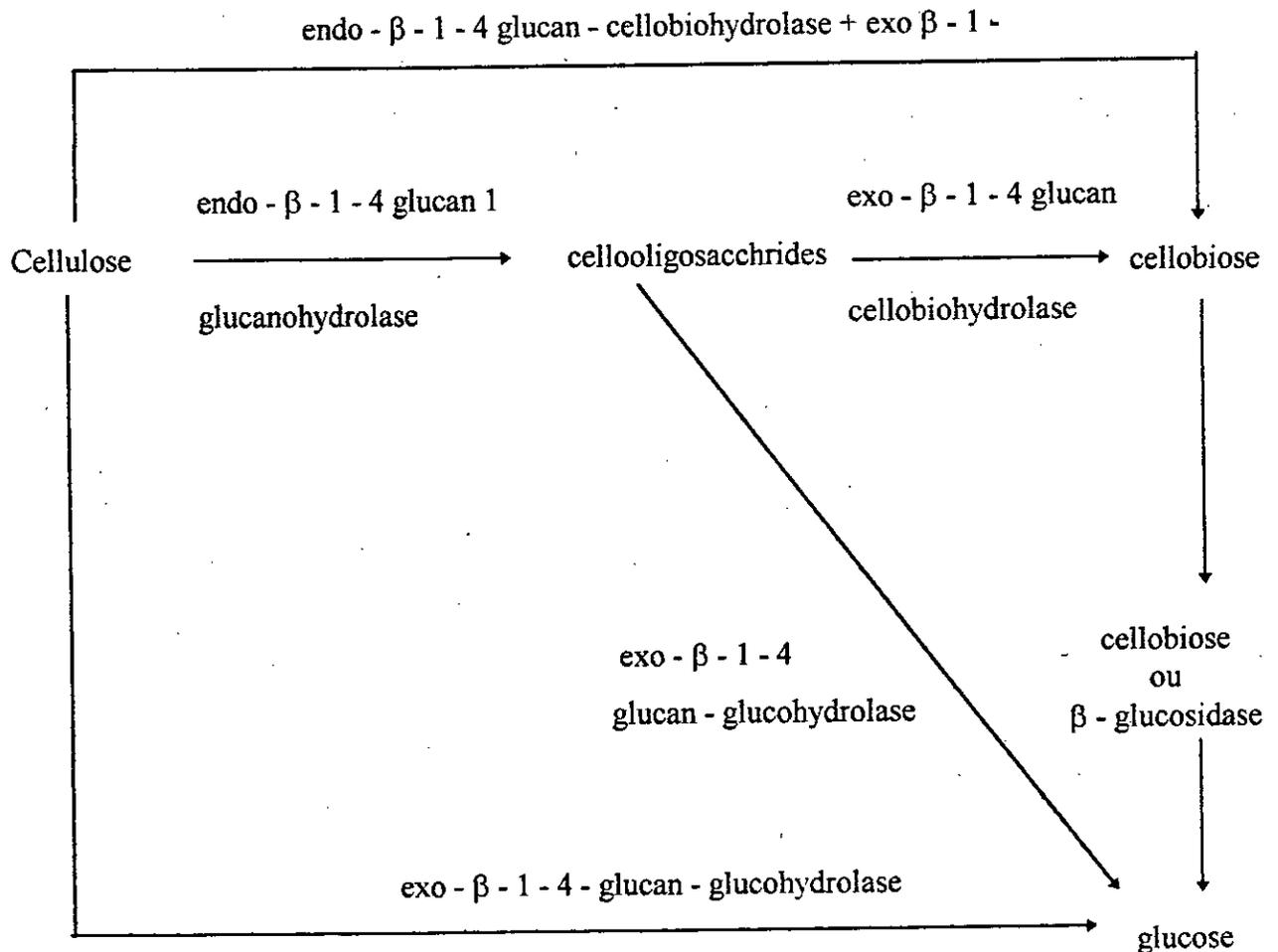


Figure (15) : Mécanisme général de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose [22].

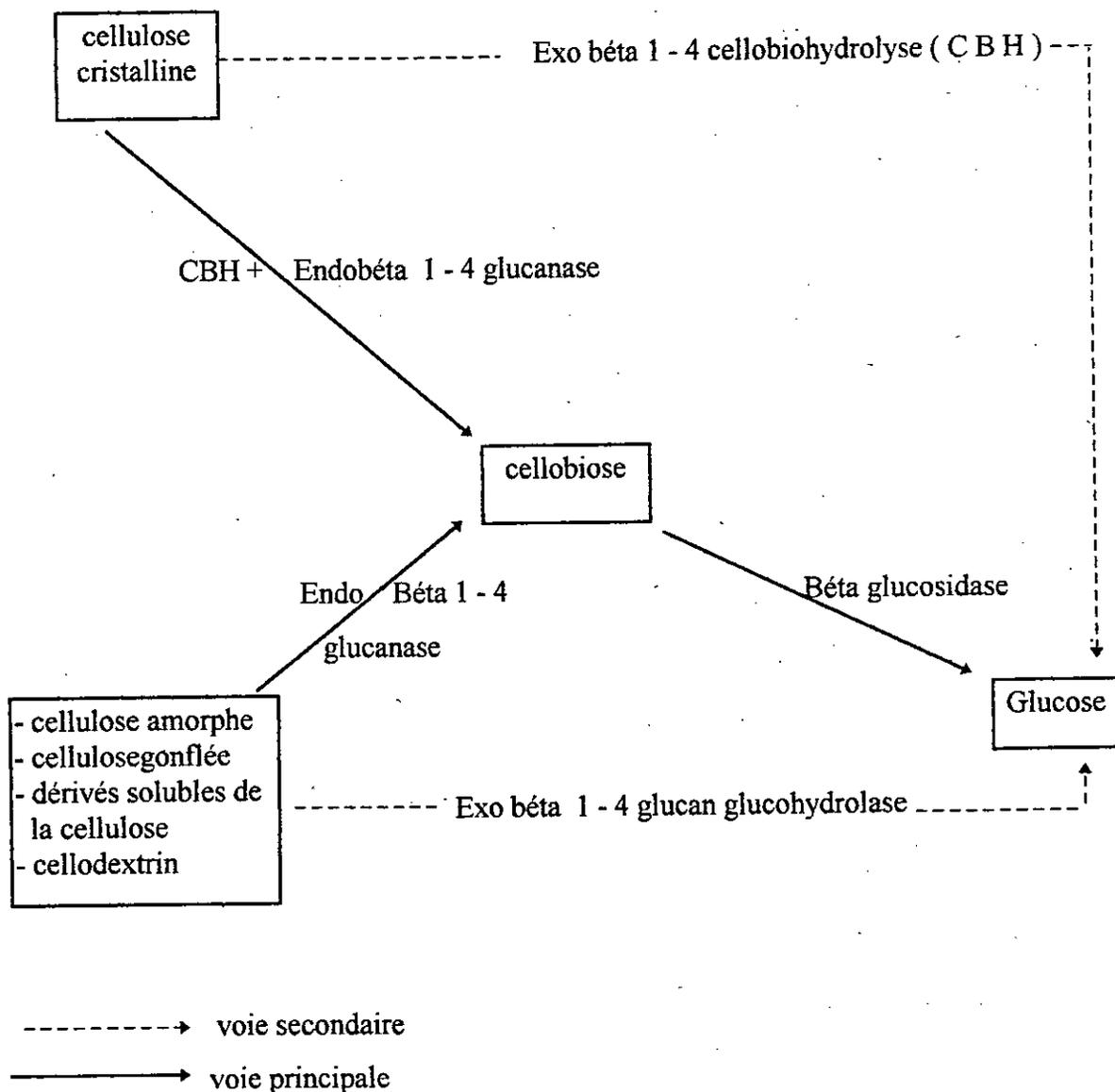


Figure (16) : Dégradation enzymatique de la cellulose.

3- Régulation enzymatique:

L'activité du complexe cellulasique est soumise à une régulation précise à travers les inhibitions subies par chacun des constituants.

Les β - glucosidases sont très fortement inhibées par la gluconolactone. Chez la trichoderma reesei, la constante d'inhibition pour ce composé est de $3,2 \cdot 10^{-5}$ M. Le glucose provoque aussi une inhibition compétitive mais plus faible. Enfin, ces enzymes sont inhibées par leur substrat, le cellobiose.

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

4- Cinétique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose.

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

En fait, aucun modèle alternatif décrivant ce phénomène de catalyse hétérogène n'est satisfaisant, et ceci pour raisons principales:

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

Quelques grands traits peuvent néanmoins être dégagés. La vitesse initiale de la réaction est sous la dépendance des deux caractéristiques structurales majeures de la cellulose: la surface spécifique et la cristallinité. L'absorption des protéines solubles sur le substrat est linéairement reliée à sa surface spécifique, mais la capacité des enzymes absorbées à provoquer l'hydrolyse dépend étroitement de la cristallinité initiale.

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

La surface spécifique ne semble pas être le facteur limitant l'hydrolyse puisque celle-ci provoque un fractionnement de la cellulose en particules plus petites. Par ailleurs, si pour certains auteurs la cristallinité demeure pratiquement constante au cours de la dégradation, d'autre ont montré qu'une augmentation significative de cristallinité rend la cellulose de moins en moins digestible au fur et à mesure que l'hydrolyse progresse ceci indiquerait que les zones amorphes sont préférentiellement attaquées.

Enfin, les produits de la réaction s'accumulent et provoquent une inhibition dont la mécanisme le plus plausible est une inhibition non compétitive [3].

5- Effet de la cellulose sur l'hydrolyse enzymatique:

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

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

L'état de la cellulose, défini suivant ces trois paramètres conditionne la vitesse et le rendement de l'hydrolyse enzymatique[3].

6- Effet de la lignine sur l'hydrolyse:

La lignine constitue l'obstacle majeur pour l'attaque enzymatique du matériel ligno-cellulosique. En effet, la relation entre le degré de délignification et la vitesse d'hydrolyse par le *trichoderma-reesei* est représenté par la figure (17) [3].

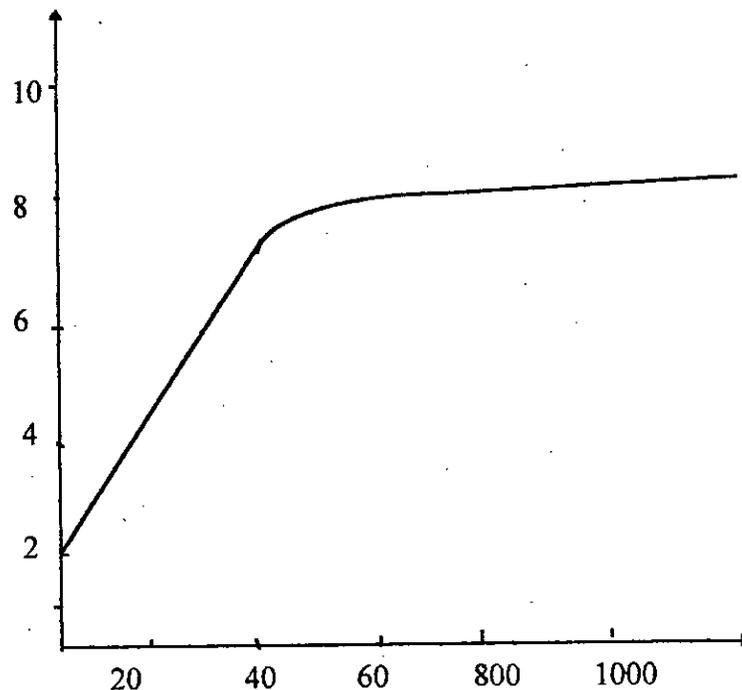


Figure (17)

Fan et al 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 atteint 50 %. Au delà cette Valeur, la vitesse d'hydrolyse augmente très peu [27].

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I



**DETERMINATION DES PRINCIPALES
CARACTERISTIQUES DU SUBSTRAT**

1- Introduction:

Les résultats rapportés par différents auteurs montrent que la composition chimique du grignon est très variable.

Les facteurs propres à l'olive (état de maturité, variété), les proportions relatives des différentes fractions (pellicules, pulpe, coque, amandon) et le procédé d'extraction de l'huile font que la composition chimique de ce résidu varie dans de larges limites. L'objectif du présent chapitre est la détermination de la composition chimique de notre substrat.

2- Matériel et Méthodes:

2.1- Origine des échantillons:

Le grignon utilisé fut produit dans la région de Tadmaït, durant la campagne oléicole de 1995 - 1996. Une quantité de 10 Kg a été prélevée, directement au moulin de l'huilerie qui utilise un mélange de variétés d'olives sur lequel elle applique un procédé d'extraction classique « double pression ».

2.2- Préparation du substrat:

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

Il a été gardé pendant quelques jours en sacs de plastique, puis traité comme suit:

a- séchage:

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

b- Broyage:

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

c- Tamisage:

La poudre obtenue a été tamisée entre deux tamis de granulométrie égale à 450 µm et 710 µm, en vue d'obtenir un substrat uniforme.

2.3- Composition chimique du substrat expérimental:

La matière sèche (MS), les cendres totales (CT), les matières grasses (MG), la cellulose brute (CB) et les matières azotées totales (MAT) ont été déterminées par les méthodes classiques d'analyses des fourrages [38].

Les composés pariétaux (lignine, cellulose, hémicellulose) ont été déterminés par la méthode de Van Soest [38].

a)- Matière sèche:

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

b)- Cendres totales:

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

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

c)- Matières azotées totales:

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

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

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

d)- Matière grasses

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

e)- Cellulose brute:

La teneur en cellulose brute (CB) est déterminée par la méthode de Weende [36]. Dans cette méthode les matières cellulosiques correspondent au résidu organique insoluble obtenu après attaque acide (H_2SO_4 , 0.26 N) et alcaline (NaOH 0.31N) du substrat.

f)- Composés pariétaux:

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

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

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la matière sèche.

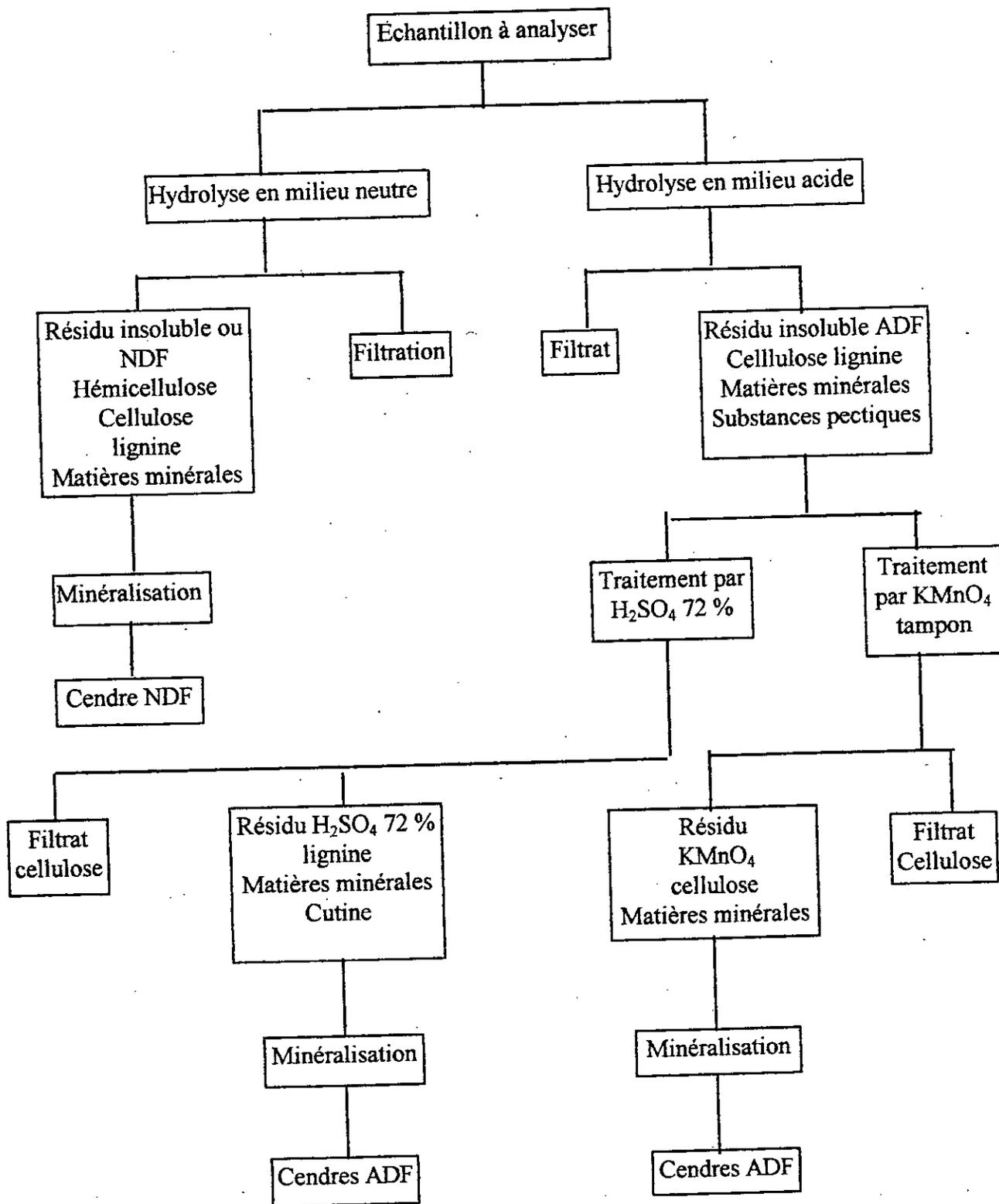


Schéma 2 : Schéma de principe de la méthode de VAN SEOST [38].

3- Résultats:

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

Les teneurs moyennes en matières sèches, matières organiques, matières grasses, cellulose brute, matières azotées totales, neutral detergent fiber, acid détergent fiber, cellulose vraie, hémicellulose et lignine sont présentées sur la tableau (6):

Matière sèche	89.18
Matière organique	93.12
Matières grasses	11.60
Cellulose brute	42.89
Matières azotées totales	7.02
Cendres totales	4.87
Neutral detergent fiber	73.06
Acid detergent fiber	39.13
Cellulose vraie	29.14
Hémicellulose	33.83
Lignine	13.89

Tableau (6) : Principales caractéristiques du substrat expérimental en % de la matière sèche.

Les teneurs moyennes en éléments minéraux K^+ , Ca^{++} et Na^+ sont présentées sur le tableau (7).

K^+	0.098
Ca^{++}	0.087
Na^+	0.019

Tableau (7) : Les teneurs en éléments minéraux en % de M.S.

La teneur en cendres totales trouvée expérimentalement (4.87 % de la matière sèche), coïncide avec la valeur citée en bibliographie qui est de l'ordre de 5 % de la matière sèche [7].

Les teneurs en éléments minéraux obtenus sont du même ordre que celles citées par d'autres auteurs [7]. En effet la prédominance de K^+ et Ca^{++} est confirmée.

La teneur en matière grasses trouvée est de l'ordre de 11.6 % de la matière sèche. Cette valeur est proche de celle citée par NEFZAOUI [9] qui est de l'ordre de 13 % de la matière sèche.

L'écart trouvé entre ces deux valeurs est lié à plusieurs facteurs: (type de presse, durée de traitement, etc).

La teneur en matière azotées totales (MAT) obtenue est de 7.02 % de la matière sèche. Des teneurs aussi faibles ont été mesurées par NEFZAOUI [9] qui obtient des valeurs allant de 5 à 10.3 % de la matière sèche, témoignant de la faible valeur énergétique de ce substrat.

La teneur en cellulose brute du grignon traité est élevée. En effet, nous obtenons des valeurs de l'ordre de 42.89 % de la MS. C'est cette teneur élevée en cellulose brute qui va être l'objet de l'hydrolyse enzymatique. La même valeur a été citée en bibliographie [7].

La méthode de Van Soest montre que les constituants pariétaux de la membrane représente un constituant essentiel du grignon 73.06 % de la matière sèche. Des teneurs du même ordre de grandeur ont été enregistrées par HAMMOUDA et GACEM [6], qui ont travaillé respectivement sur le marc de raisin (72 % de la M.S) et la paille de blé (88 % de la M.S).

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

4- Discussion:

Sur la base de la composition chimique de Weende (CB, MAT) et la teneur en fibres (NDF), les grignons sont apparentés à la paille. Cependant la séparation des fibres en cellulose, hémicellulose et lignine, témoigne de la singularité de ce sous-produit. Car malgré un contenu cellulosique et une teneur en matières azotées totales favorables, la production en lignine (18 %) représente toujours l'obstacle majeur pour l'hydrolyse enzymatique.

La fraction pariétale des grignons est caractérisée par une forte teneur en ADF (39.13 %) que le tamisage réduit légèrement.

Les effets inhibiteurs que peuvent exhiber les grignons d'olives, peuvent être résumés comme suit:

- L'effet de la quantité de matières grasses
- l'oxydation possible des matières grasses et leur effet toxique
- La teneur élevée en lignine permet d'expliquer la difficulté d'hydrolyse enzymatique.

5- Conclusion:

La synthèse de ce chapitre était principalement axée sur la connaissance de la composition chimique des grignons d'olives.

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

CHAPITRE II



PRETRAITEMENT CHIMIQUE

1- Introduction:

Les prétraitements chimiques en général et les prétraitements alcalins en particulier ont prouvé leur efficacité dans l'augmentation du rendement de l'hydrolyse enzymatique. Pour cette raison nous avons opté pour le prétraitement à la soude caustique [33].

2- Effet des paramètres physico-chimiques sur le prétraitement à la soude caustique:

Selon Meleion (1978), l'efficacité du prétraitement à la soude caustique dépend de plusieurs paramètres; à savoir le taux de réactif, la température, la durée de traitement et la nature du substrat.

Dans notre étude, le prétraitement a été effectué à une concentration de 100 g / l de soude,, une température de 90 °C et une durée de traitement de 1 heure.

D'après des études faites précédemment, ces conditions nous amènent aux meilleur rendement de saccharification [7].

3- Influence du prétraitement à la soude caustique sur la composition du substrat traité:

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

Pour cela, nous traitons un échantillon de 20 g de grignon à la soude, dans les conditions opératoires optimales précédemment déterminées.

3.1- Mode opératoire:

- Préparer 200 ml de solution contenant 20 g de grignon
- Mettre la solution préparée dans un bêcher et le placer sur une plaque chauffante.
- Mettre l'agitation en marche (200 trs / mn).
- Ajuster la température à 90 °C.
- Après avoir fixé tous les paramètres opératoires dans le bêcher à un temps initial t_0
- Laisser l'expérience en marche durant 1 heure
- Filtrer la solution à travers un filtre en soie de Nylon
- Récupérer le résidu et le sécher à l'étuve à 70 °C.
- Doser sur le résidu séché, les teneur en cendres totales, en matières grasses, en matières azotées totales et en cellulose brute, par les méthodes classiques d'analyse des fourrages.

3.2- Résultats:

Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau: (8).

	M.S	M.O	M.G	C. B	M.A.T	C.T
Substrat non traité	89.18	93.12	11.60	42.89	7.02	4.87
Substrat traité par la soude	73.18	80.65	1.84	27.64	5.35	10.30

Tableau (8)

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

En effet une diminution de la teneur en matière grasse est enregistrée. La teneur qui était de 11.60 % chute à 1.84 % suite à ce prétraitement.

L'effet du traitement se traduit également par une élévation de la teneur en matières minérales: la teneur qui était de 4.87 % passe à 10.30 % de la matière sèche.

Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par d'autres auteurs [23] et [7].

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

3.3- Discussion:

Plusieurs auteurs ont mis en évidence la liaison entre la lignine et les glucides et en particulier l'hémicellulose (BOLKER, 1963; HARTLEY et JONES, 1972; BACON et GORDON, 1975).

Les groupements acétyliques de la lignine forment des esters avec les groupements xyloxy des hémicelluloses et gênent dès lors l'accessibilité des enzymes.

L'acide p-coumarique, l'acide férulique ainsi que de petite quantité de vanilline donnent également lieu à des liaisons entre les chaînes de lignine et les glucides pariétaux. En fait les acides phénoliques comme la vanilline, sont des précurseurs de la lignine, de sorte que ces liaisons sont en partie responsables du faible rendement enzymatique (BAILEY, 1973).

Ces complexes et les ponts d'hydrogène formés à l'intérieur des chaînes glucidiques, détruisent le pouvoir de dilatation de la cellulose et empêchent les grandes molécules, comme les enzymes d'accéder à la cellulose.

Seuls les composés de faibles poids moléculaire, comme la soude peuvent encore pénétrer dans le complexe formé par la lignine et les glucides pariétaux (Bergner et al, 1974)

Les parois cellulaires continuent à grossir jusqu'à ce que les cellules se séparent et que les liaisons intercellulaires soient détruites. En perdant sa structure, le complexe lignine-cellulose devient accessible à la cellulase.

4- Efficacité du prétraitement à la soude caustique:

Le prétraitement à la soude caustique est efficace si le rendement de saccharification est assez élevé. Pour cela nous avons effectué cette étude.

4.1- Mode opératoire:

- Préparer 200 ml de solution contenant 20 g de NaOH
- Mettre la solution préparée dans un bêcher et le placer sur une plaque chauffante.
- Mettre l'agitation en marche (200 trs / mn).
- Ajuster la température à 90 °C.
- Après avoir fixé tous les paramètres opératoires, introduire la quantité de grignon préalablement pesée dans le bêcher à un temps initial t_0
- Laisser pendant 2 heures.
- Prendre des prélèvements de 1 ml chacun à des intervalles de temps rapprochés en début de réaction, puis un peu plus éloignés par la suite avec filtration immédiate.
- Les sucres totaux contenus dans le filtrat sont alors quantifiés par la méthode de Dubois et al [38].
- Récupérer le résidu, le laver à l'eau distillée, le neutraliser à pH = 7 puis le sécher à l'étuve à 37 °C.
- Doser sur le résidu séché la matière sèche

4.2- Résultats:

Ces résultats sont représentés par la figure (18)

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

Le dosage de la M.S a montré une perte de 33.5 % de celle-ci, ce qui est favorable à une hydrolyse enzymatique [4].

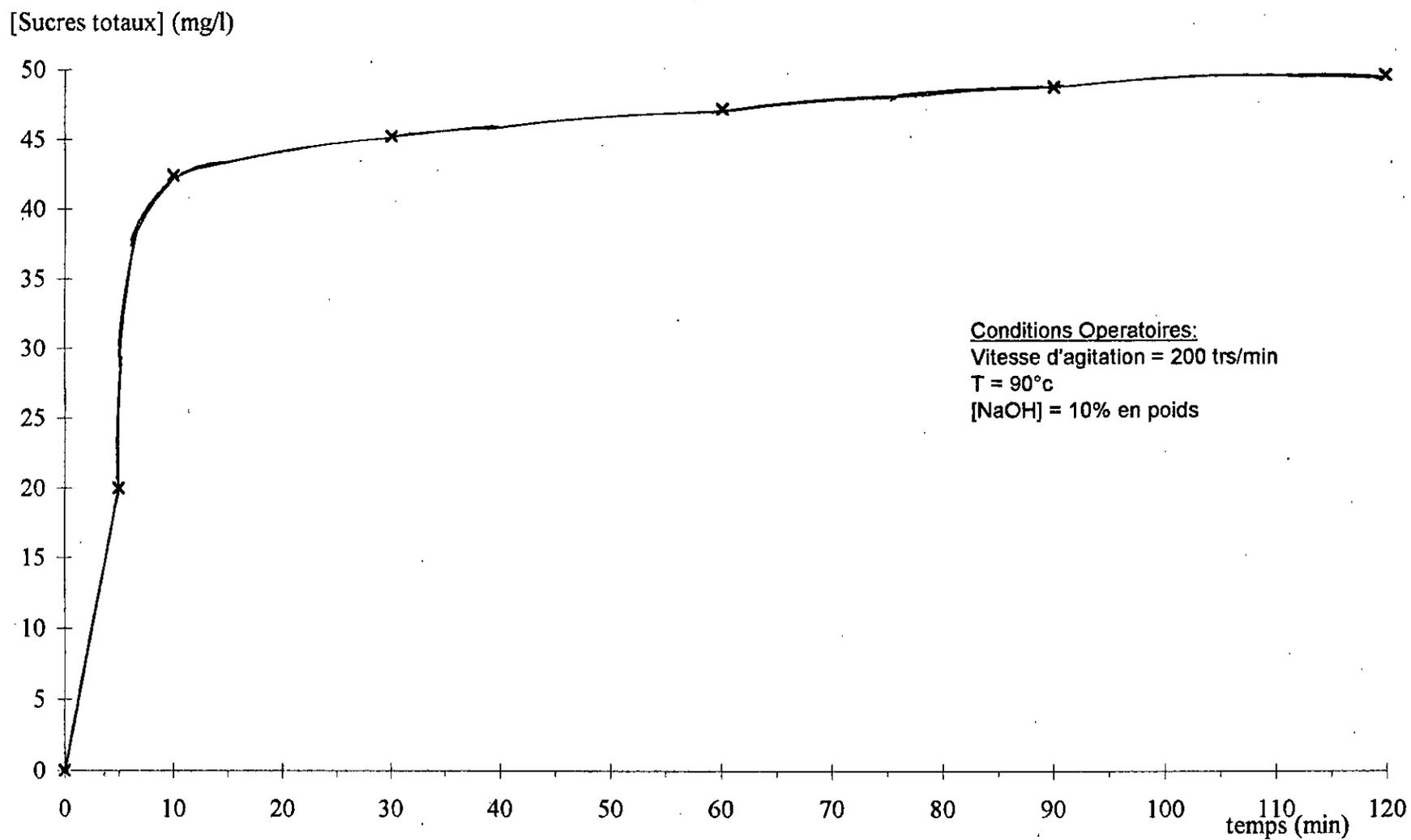


Figure 18 : Evolution de la concentration des sucres totaux en fonction du temps

temps (mn)	mg sucres totaux	g sucres totaux	rendement
	l	g de grignon	
0	5	$0.5 \cdot 10^{-4}$	1.29
5	20	$2.00 \cdot 10^{-4}$	5.15
10	42.400	$4.24 \cdot 10^{-4}$	10.12
30	45.200	$4.52 \cdot 10^{-4}$	11.74
60	47.200	$4.72 \cdot 10^{-4}$	12.25
90	48.800	$4.88 \cdot 10^{-4}$	12.67
120	49.600	$4.96 \cdot 10^{-4}$	12.88

4.3- Discussion:

Le lavage et la neutralisation du produit traité pour éliminer l'excès d'alcali semble être nécessaire.

GODDEN rapportait que 35 % de la matière sèche du grignon étaient perdus quand le grignon traité était lavé.

THUS, SADDLER et al [25] ont démontré que la production de sucre est élevée si le substrat traité est lavé.

Le prétraitement du substrat à la soude caustique à 10 % semble être efficace car le rendement de la saccharification est élevé (12,88).

5- Conclusion:

Le prétraitement des grignons d'olives avec les alcalis en particulier la soude caustique à 10 % suivi d'un lavage et d'une neutralisation, constitue une alternative fort attractive. Car il entraîne des modifications au niveau de la fraction pariétale: diminution des teneurs en hémicellulose, cellulose et lignine. Donc

- diminue la cristallinité du substrat;
- augmente la surface spécifique.

ce qui facilitera l'accessibilité de la cellulase lors de l'hydrolyse enzymatique.

CHAPITRE III



HYDROLYSE ENZYMATIQUE

1- Introduction:

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

La cellulase utilisée est référencée commercialement sous le N° 193424. Elle est caractérisées par un pH optimum de 4.5 et une température de 37 °C données par le fabricant. Le réacteur utilisé est un réacteur en batch, il est schématisé par la figure (19)

2- Etude de la cinétique enzymatique en fonction de la concentration d'enzyme:

Pour mener à bien notre cinétique, il a fallu d'abord déterminer la quantité d'enzyme permettant d'aboutir au meilleur rendement de saccharification.

Ainsi, nous avons travaillé à des concentration d'enzyme de l'ordre de :

1,25 g/l, 2,5 g/l, 5 g/l, 6,25 g/l.

Quant aux autres paramètres, nous les avons fixé:

- Une concentration en substrat de 12,125 g / l ;
- Une température de 50 °C;
- Un pH de 4,5;
- Une durée de traitement de 5 heures;
- Une agitation modérée de 270 tours / mn.

2.1- Mode opératoire:

- Préparer la solution d'enzyme par incorporation de celle-ci dans de solution tampon à pH = 4,5;
- Remplir le réacteur avec la solution d'enzyme préparée;
- Ajuster la température à 37 °C;
- Après avoir fixé toutes les conditions opératoires, la quantité de substrat préalablement pesée est introduite rapidement dans le réacteur à un temps t_0 représentant le temps initial de l'hydrolyse.
- 30 secondes après, un échantillons de 50 μl est prélevé du mélange réactionnel puis transvasé dans un tube contenant 10 ml de solution tampon à pH = 7 afin d'arrêter la réaction d'hydrolyse
- Prendre par la suite plusieurs prélèvements de 50 μl à des intervalles de temps fixés en minutes, puis les transvaser dans des tubes contenant 10 ml de solution tampon à pH = 7.

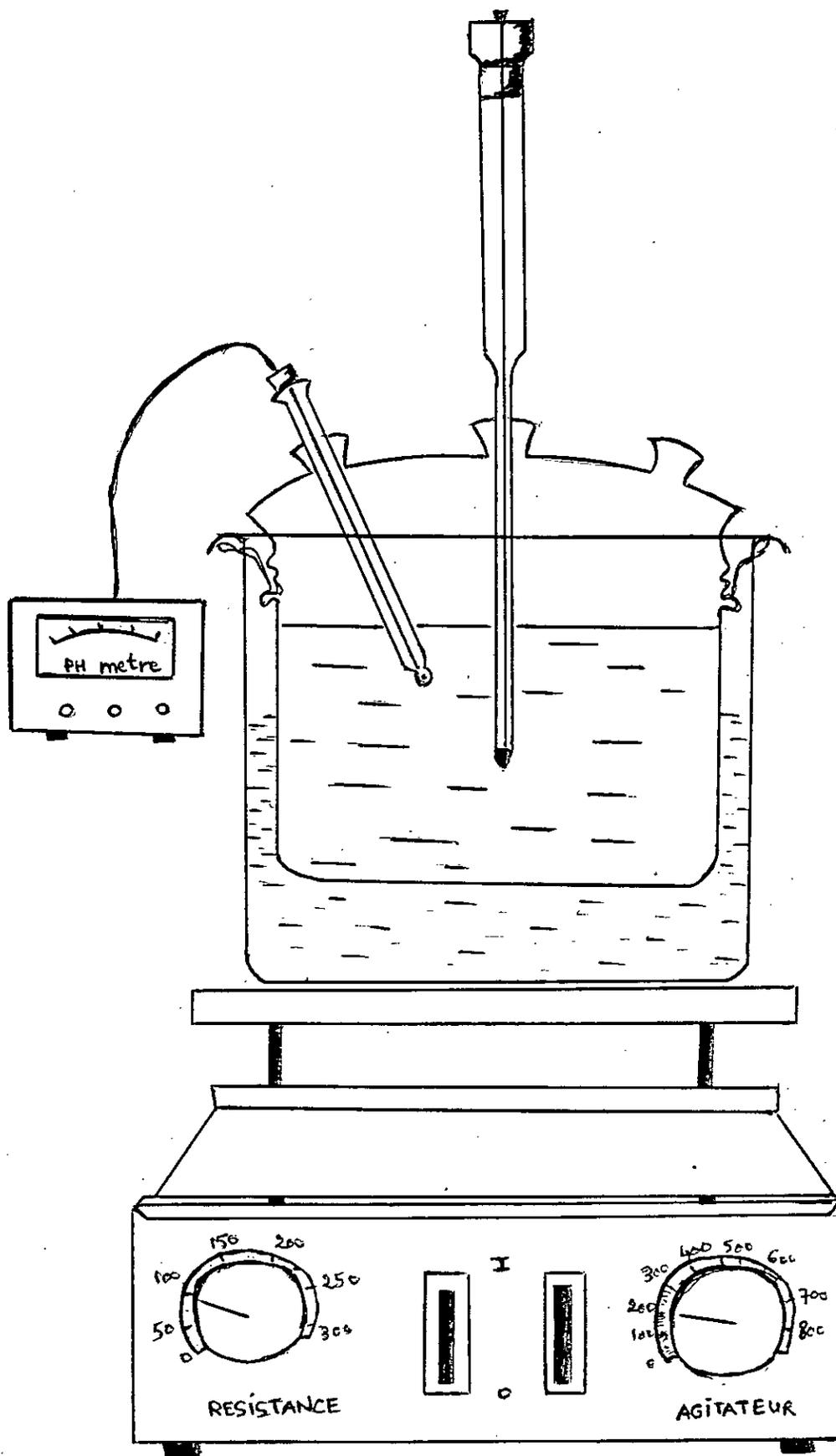


Figure (19) : Le bioréacteur

- 10 à 15 minutes après le prélèvement, le contenu du tube est filtré à travers de la soie de Nylon.
- Les sucres totaux contenus dans le filtrat sont alors quantifiés par la méthode calorimétrique de Dubois et al [36].

2.2- Résultats:

A partir des résultats obtenus sur les tableaux (10, 11, 12, 13), nous traçons le graphe donnant l'évolution de la concentration des sucres totaux en fonction du temps.

Ces résultats sont portés sur la figure (20)

$$E = 1,25 \text{ g/l}$$

Temps (min)	mg de sucres totaux	g de sucre totaux	rendement d'hydrolyse
	l	g de grignon	
0	34.06	$3.406 \cdot 10^{-4}$	8.84
2	39.54	$3.954 \cdot 10^{-4}$	10.27
5	41.26	$4.126 \cdot 10^{-4}$	10.71
7	43.01	$4.301 \cdot 10^{-4}$	11.17
10	46.45	$4.645 \cdot 10^{-4}$	12.06
15	47.71	$4.771 \cdot 10^{-4}$	12.39
20	49.24	$4.924 \cdot 10^{-4}$	12.78
30	52.30	$5.230 \cdot 10^{-4}$	13.58
40	57.45	$5.745 \cdot 10^{-4}$	14.92
60	62.67	$6.267 \cdot 10^{-4}$	16.27
80	67.77	$6.777 \cdot 10^{-4}$	17.60
100	74.46	$7.446 \cdot 10^{-4}$	19.22
120	80.00	$8.001 \cdot 10^{-4}$	20.77
150	87.33	$8.733 \cdot 10^{-4}$	22.59
180	95.87	$9.587 \cdot 10^{-4}$	24.90
240	107.01	$10.701 \cdot 10^{-4}$	27.79
300	110.00	$11.000 \cdot 10^{-4}$	28.57

Rendement maximal = rendement du prétraitement + rendement d'hydrolyse

rendement maximal = 12.88 + 28.57 = 41.45 % $V'_1 = 10 \text{ mg/l.min}$

$$RH = \frac{P}{S_0} \times 100 \quad \text{avec: } P = \text{concentration en sucres totaux finale}$$

$$S_0 = \text{concentration initiale en sucres totaux}$$

Tableau (10)

E = 2,5 g/l

Temps (min)	mg de sucres totaux	g de sucre totaux	rendement d'hydrolyse
	l	g de grignon	
0	48.11	$4.811 \cdot 10^{-4}$	12.49
2	52.77	$5.277 \cdot 10^{-4}$	13.70
5	54.33	$5.433 \cdot 10^{-4}$	14.11
7	56.33	$5.633 \cdot 10^{-4}$	14.63
10	57.22	$5.722 \cdot 10^{-4}$	14.86
15	59.11	$5.911 \cdot 10^{-4}$	15.35
20	62	$6.200 \cdot 10^{-4}$	16.10
30	66.88	$6.688 \cdot 10^{-4}$	17.37
40	70.88	$7.088 \cdot 10^{-4}$	18.41
60	80	$8.000 \cdot 10^{-4}$	20.77
80	88.77	$8.877 \cdot 10^{-4}$	23.05
100	95.55	$9.555 \cdot 10^{-4}$	24.81
120	103	$10.300 \cdot 10^{-4}$	26.75
150	116	$11.600 \cdot 10^{-4}$	30.12
180	124.44	$12.444 \cdot 10^{-4}$	32.31
240	135.22	$13.522 \cdot 10^{-4}$	35.12
300	136.88	$13.688 \cdot 10^{-4}$	35.55

Rendement maximal = 12.88 % + 35.55 % = 48.43 %

$V'_2 = 12 \text{ mg/l.min}$

Tableau (11)

E = 5 g/l

Temps (min)	mg de sucres totaux	g de sucre totaux	rendement d'hydrolyse
	l	g de grignon	
0	53.22	$5.322 \cdot 10^{-4}$	13.82
2	58.55	$5.855 \cdot 10^{-4}$	15.20
5	69.77	$6.977 \cdot 10^{-4}$	18.12
7	74.44	$7.444 \cdot 10^{-4}$	19.33
10	75.77	$7.577 \cdot 10^{-4}$	19.68
15	79.55	$7.955 \cdot 10^{-4}$	20.66
20	80.88	$8.088 \cdot 10^{-4}$	21.00
30	84.00	$8.400 \cdot 10^{-4}$	21.81
40	89.10	$8.91 \cdot 10^{-4}$	23.14
60	98.88	$9.888 \cdot 10^{-4}$	25.68
80	107.22	$10.722 \cdot 10^{-4}$	27.84
100	113.11	$11.311 \cdot 10^{-4}$	29.37
120	122.11	$12.211 \cdot 10^{-4}$	31.71
150	132.66	$13.266 \cdot 10^{-4}$	34.45
180	140.66	$14.066 \cdot 10^{-4}$	36.53
240	156.44	$15.644 \cdot 10^{-4}$	40.63
300	157.77	$15.777 \cdot 10^{-4}$	40.97

Rendement maximal = 12.88 % + 40.97 % = 53.85 %

$V'_3 = 14 \text{ mg/l.min}$

Tableau (12)

$$E = 6.25 \text{ g/l}$$

Temps (min)	mg de sucres totaux	g de sucre totaux	rendement d'hydrolyse
	l	g de grignon	
0	63.24	$6.324 \cdot 10^{-4}$	16.42
2	66.44	$6.644 \cdot 10^{-4}$	17.25
5	70.10	$7.010 \cdot 10^{-4}$	18.20
7	75.77	$7.577 \cdot 10^{-4}$	19.68
10	80.47	$8.047 \cdot 10^{-4}$	20.90
15	87.12	$8.712 \cdot 10^{-4}$	22.62
20	94.34	$9.434 \cdot 10^{-4}$	24.50
30	103.00	$10.300 \cdot 10^{-4}$	26.75
40	109.44	$10.944 \cdot 10^{-4}$	28.42
60	116.32	$11.632 \cdot 10^{-4}$	30.21
80	123.54	$12.354 \cdot 10^{-4}$	32.07
100	126.81	$12.681 \cdot 10^{-4}$	32.93
120	130.00	$13.000 \cdot 10^{-4}$	33.76
150	139.35	$13.935 \cdot 10^{-4}$	36.19
180	144.40	$14.440 \cdot 10^{-4}$	37.50
240	155.44	$15.574 \cdot 10^{-4}$	40.45
300	156.28	$15.628 \cdot 10^{-4}$	40.59

$$\text{Rendement maximal} = 12.88 \% + 40.59 \% = 53.47 \%$$

$$V_4 = 16 \text{ mg/l.min.}$$

Tableau (13)

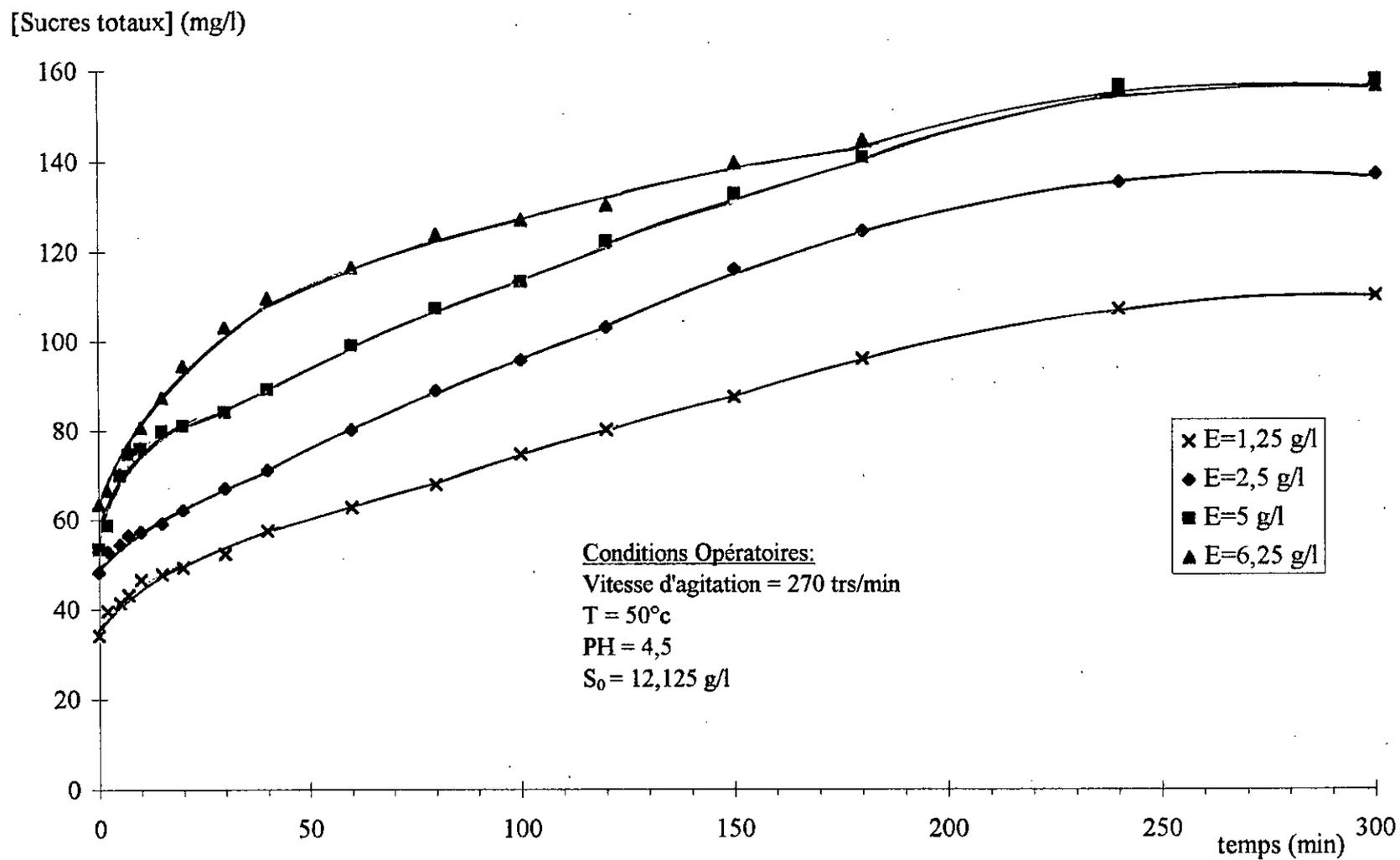


Figure 20 : Influence de la concentration d'enzymes sur la cinétique d'hydrolyse du grignon d'olive par cellulose CT

2.3- Discussion:

A partir de ces figures nous constatons que :

- Quelque soit la concentration en enzyme, il y'a formation instantanée de sucres dès que celle-ci est introduite dans le bêcher.

- Les deux concentration de 5 g / l et 6.25 g / l de cellulase donnerait le même rendement de saccharification et le plus élevé dans nos conditions opératoires.

Dans notre étude on a choisi une concentration de 5 g / l de cellulase qui donne un bon rendement d'hydrolyse au lieu de 6.25 g / l et cela dans le cadre d'économiser l'enzyme.

- Une vitesse d'hydrolyse élevée pendant les premières minutes, puis décroît rapidement au cours de la réaction. Ce ralentissement de l'hydrolyse est dû à plusieurs facteurs:

❖ l'hétérogénéité de substrat : les parties les plus facilement dégradables sont hydrolysées les premières.

❖ l'inhibition par les produits de la réaction;

❖ l'inactivation thermique et l'adsorption irréversible d'une partie des enzymes sur le substrat.

Les mêmes résultats ont été approuvés par POURQUIE J et al (1984).

❖ Les vitesses maximales pour chaque concentration d'enzyme sont dans l'ordre suivant: $V'_1 = 10 \text{ mg / l.min}$, $V'_2 = 12 \text{ mg / l.min}$, $V'_3 = 14 \text{ mg / l.min}$, $V'_4 = 16 \text{ mg / l.min}$ qui coïncident avec celle citées en bibliographie [35].

3- Etude de la cinétique enzymatique en fonction de la concentration de substrat:

L'étude expérimentale de la cinétique d'hydrolyse est réalisée par le dosage des sucres totaux dans le mélange réactionnel en fonction du temps.

Ainsi, nous avons travaillé à des concentration en substrat de l'ordre de :

30 g / l, 50 g / l, 70 g / l, 90 g / l, 110 g / l.

Quant aux autre paramètres, nous les avons fixé:

- Une concentration d'enzyme de 5 g / l.

- Une température de 50 °C

- Un pH de 4.5

- Une durée de traitement de 5 heures.

- Une agitation modérée de 270 tours / mn

3.1- Mode opératoire:

Le même mode opératoire a été suivi lors de la détermination de la quantité d'enzyme optimale.

3.2- Résultats:

A partir des résultats obtenus sur les tableaux (14, 15, 16, 17, 18, 19), nous traçons le graphe donnant l'évolution de la concentration des sucres totaux en fonction du temps, pour chaque concentration de substrat.

S = 30 g/l

Temps (min)	mg de sucres totaux	g de sucre totaux	rendement d'hydrolyse
	l	g de grignon	
0	11.07	$1.107 \cdot 10^{-4}$	2.87
2	15.33	$1.533 \cdot 10^{-4}$	3.98
5	18.61	$1.861 \cdot 10^{-4}$	4.83
7	20.24	$2.024 \cdot 10^{-4}$	5.25
10	26.67	$2.167 \cdot 10^{-4}$	5.28
15	24.77	$2.477 \cdot 10^{-4}$	6.43
20	26.55	$2.655 \cdot 10^{-4}$	6.89
30	28.45	$2.845 \cdot 10^{-4}$	7.38
40	28.45	$2.845 \cdot 10^{-4}$	7.89
60	30.81	$3.081 \cdot 10^{-4}$	8.00
80	35.14	$3.514 \cdot 10^{-4}$	9.12
100	33.01	$3.301 \cdot 10^{-4}$	8.57
120	34.78	$3.478 \cdot 10^{-4}$	9.33
150	40.14	$4.014 \cdot 10^{-4}$	10.42
200	45.86	$4.586 \cdot 10^{-4}$	11.91
250	51.78	$5.178 \cdot 10^{-4}$	13.44
300	52.19	$5.219 \cdot 10^{-4}$	13.55

$V_1 = 10.7 \text{ mg/l.min}$

Tableau (14)

S = 50 g/l

Temps (min)	mg de sucres totaux	g de sucre totaux	rendement d'hydrolyse
	l	g de grignon	
0	35.00	3.500	9.89
2	39.54	$3.954 \cdot 10^{-4}$	10.27
5	41.26	$4.126 \cdot 10^{-4}$	10.71
7	43.01	$4.301 \cdot 10^{-4}$	11.17
10	46.45	$4.645 \cdot 10^{-4}$	12.06
15	47.71	$4.771 \cdot 10^{-4}$	12.39
20	50.24	$4.024 \cdot 10^{-4}$	13.04
30	52.30	$5.230 \cdot 10^{-4}$	13.58
40	57.45	$5.745 \cdot 10^{-4}$	14.92
60	62.67	$6.267 \cdot 10^{-4}$	16.27
80	67.77	$6.777 \cdot 10^{-4}$	17.60
100	70.46	$7.046 \cdot 10^{-4}$	18.30
120	74.63	$7.463 \cdot 10^{-4}$	19.38
150	79.33	$7.933 \cdot 10^{-4}$	20.60
200	87.55	$8.755 \cdot 10^{-4}$	22.74
250	93.33	$9.333 \cdot 10^{-4}$	24.24
300	95.10	$9.510 \cdot 10^{-4}$	24.70

$V_2 = 20 \text{ mg/l.min}$

Tableau (15)

S = 70 g/l

Temps (min)	mg de sucres totaux	g de sucre totaux	rendement d'hydrolyse
	l	g de grignon	
0	64.42	6.442	16.73
2	69.30	$6.930 \cdot 10^{-4}$	18.00
5	74.45	$7.445 \cdot 10^{-4}$	19.33
7	77.01	$7.701 \cdot 10^{-4}$	20.00
10	88.24	$8.824 \cdot 10^{-4}$	22.91
15	85.00	$8.500 \cdot 10^{-4}$	22.07
20	89.24	$8.924 \cdot 10^{-4}$	23.16
30	104.08	$10.408 \cdot 10^{-4}$	27.03
40	113.33	$11.333 \cdot 10^{-4}$	29.43
60	122.44	$12.244 \cdot 10^{-4}$	30.80
80	125.51	$12.551 \cdot 10^{-4}$	32.60
100	127.11	$12.711 \cdot 10^{-4}$	33.01
120	126.71	$12.671 \cdot 10^{-4}$	32.91
150	130.33	$13.033 \cdot 10^{-4}$	33.85
200	135.55	$13.555 \cdot 10^{-4}$	35.20
250	140.00	$14.00 \cdot 10^{-4}$	36.36
300	144.44	$14.444 \cdot 10^{-4}$	37.51

$V_3 = 26.66 \text{ mg/l.min}$

Tableau (16)

S = 90 g/l

Temps (min)	mg de sucres totaux	g de sucre totaux	rendement d'hydrolyse
	l	g de grignon	
0	82.14	$8.214 \cdot 10^{-4}$	21.33
2	89.11	$8.911 \cdot 10^{-4}$	23.14
5	107.02	$10.702 \cdot 10^{-4}$	27.79
7	113.28	$11.328 \cdot 10^{-4}$	29.42
10	115.54	$11.554 \cdot 10^{-4}$	30.01
15	120.18	$12.018 \cdot 10^{-4}$	31.21
20	122.31	$12.231 \cdot 10^{-4}$	31.76
30	125.04	$12.504 \cdot 10^{-4}$	32.47
40	128.08	$12.808 \cdot 10^{-4}$	33.26
60	133.11	$13.311 \cdot 10^{-4}$	34.57
80	136.53	$13.653 \cdot 10^{-4}$	35.46
100	139.40	$13.940 \cdot 10^{-4}$	36.20
120	140.00	$14.000 \cdot 10^{-4}$	36.36
150	149.14	$14.914 \cdot 10^{-4}$	38.73
200	148.51	$14.851 \cdot 10^{-4}$	38.57
250	150.00	$15.000 \cdot 10^{-4}$	38.96
300	151.42	$15.142 \cdot 10^{-4}$	39.32

$V_4 = 30 \text{ mg/l.min}$

Tableau (17)

$$S = 110 \text{ g/l}$$

Temps (min)	mg de sucres totaux	g de sucre totaux	rendement d'hydrolyse
	l	g de grignon	
0	58.23	$5.823 \cdot 10^{-4}$	15.12
2	69.30	$6.930 \cdot 10^{-4}$	18.00
5	74.45	$7.445 \cdot 10^{-4}$	19.33
7	77.01	$7.701 \cdot 10^{-4}$	20.00
10	81.24	$8.124 \cdot 10^{-4}$	21.10
15	85.00	$8.500 \cdot 10^{-4}$	22.07
20	89.24	$8.924 \cdot 10^{-4}$	23.17
30	93.87	$9.387 \cdot 10^{-4}$	24.38
40	103.08	$10.308 \cdot 10^{-4}$	26.77
60	110.19	$11.019 \cdot 10^{-4}$	28.62
80	118.35	$11.835 \cdot 10^{-4}$	30.74
100	124.44	$12.444 \cdot 10^{-4}$	32.32
120	132.21	$13.221 \cdot 10^{-4}$	34.34
150	140.00	$14.000 \cdot 10^{-4}$	36.36
200	148.53	$14.853 \cdot 10^{-4}$	38.57
250	152.22	$15.222 \cdot 10^{-4}$	39.53
300	153.11	$15.311 \cdot 10^{-4}$	39.76

$$V_s = 26.66 \text{ mg / l.min}$$

Tableau (18)

Ces résultats sont portés sur les figures: (21, 22, 23, 24, 25).

On trace ensuite les tangentes à l'origine pour chaque courbe dont la pente représente la valeur de la vitesse initiale de la réaction. Ces valeurs permettent de tracer par la suite les graphes $1/V_i = f(I/S_0)$ et $1/V_i = f(S_0)$.

[Sucres totaux] (mg/l)

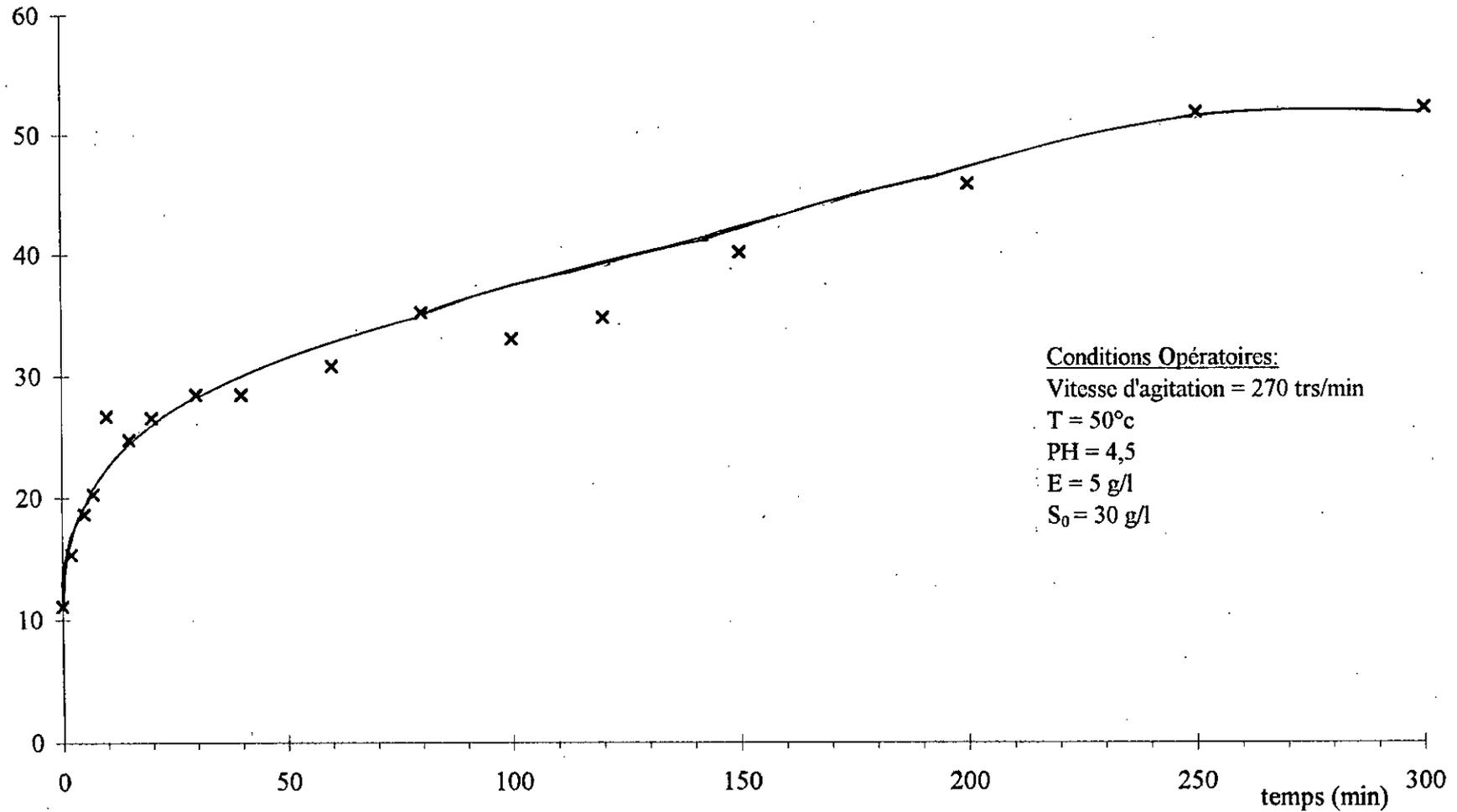


Figure 21 : Influence de la concentration du substrat sur la cinétique d'hydrolyse du grignon d'olive.

[Sucres totaux] (mg/l)

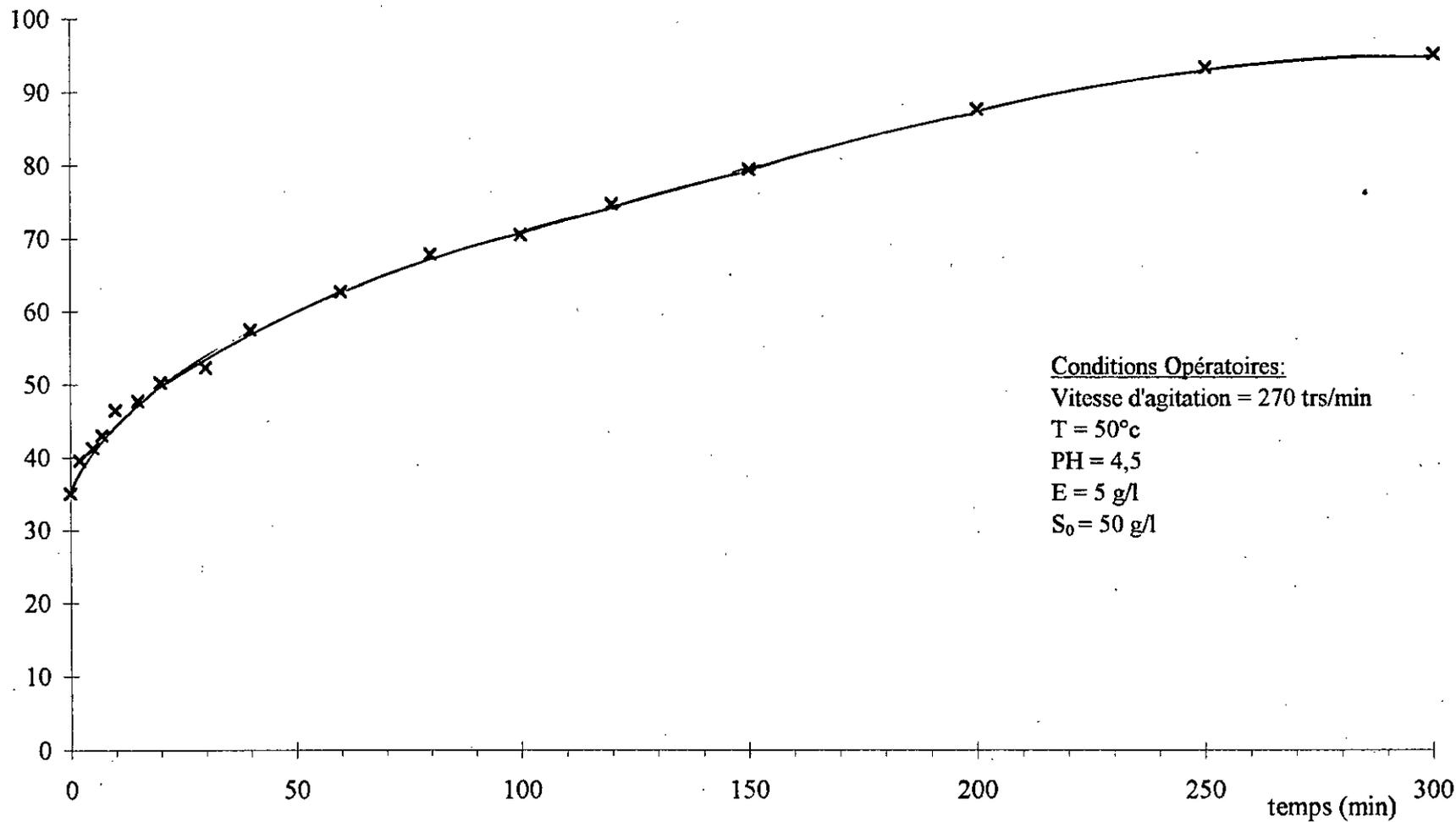


Figure 22 : Influence de la concentration du substrat sur la cinétique d'hydrolyse du grignon d'olive.

[Sucres totaux] (mg/l)

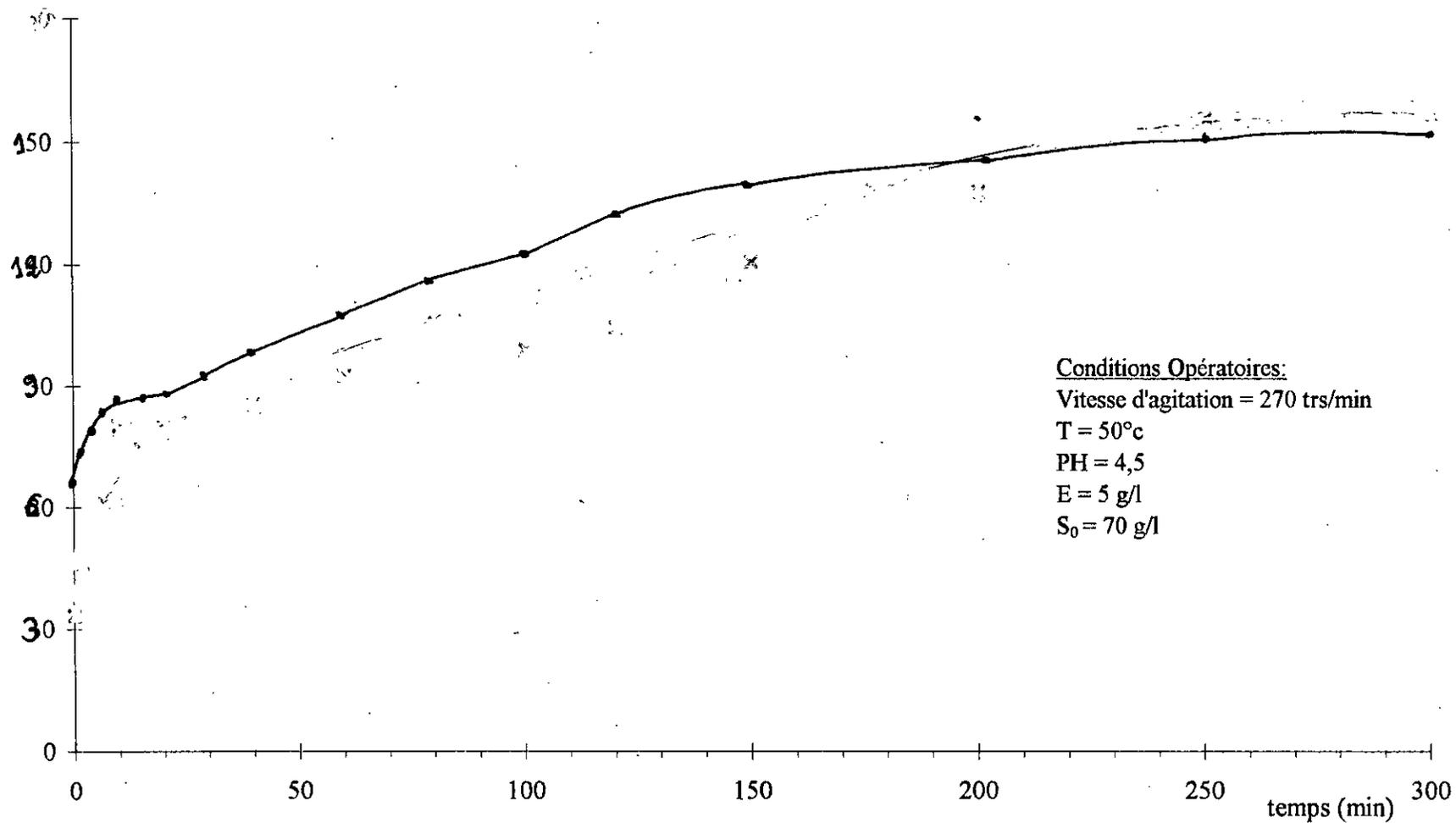


Figure 23 : Influence de la concentration du substrat sur la cinétique d'hydrolyse du grignon d'olive.

[Sucres totaux] (mg/l)

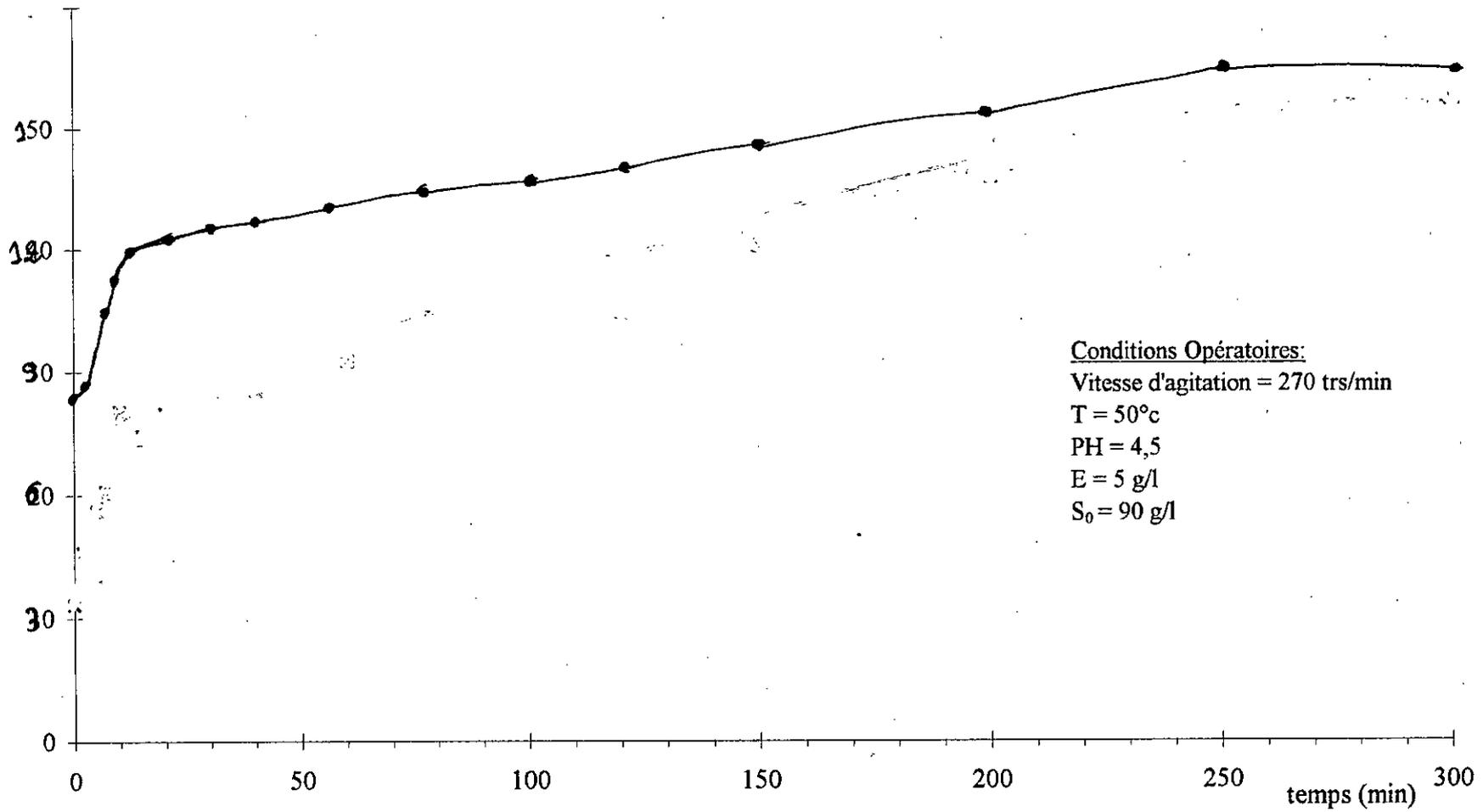


Figure 24 : Influence de la concentration du substrat sur la cinétique d'hydrolyse du grignon d'olive.

[Sucres totaux] (mg/l)

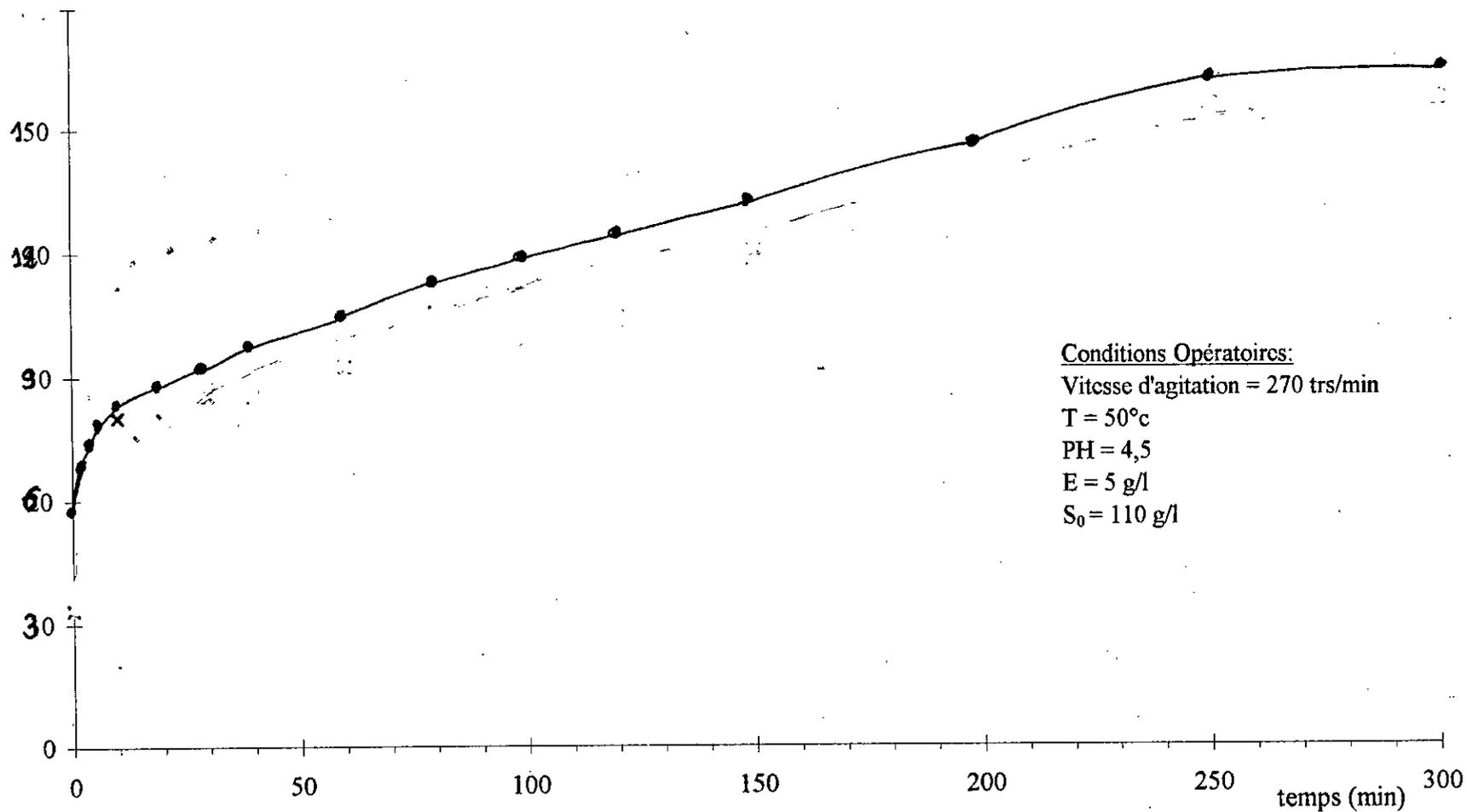


Figure 25 : Influence de la concentration du substrat sur la cinétique d'hydrolyse du grignon d'olive.

$1/V_i$ (l.min/mg)

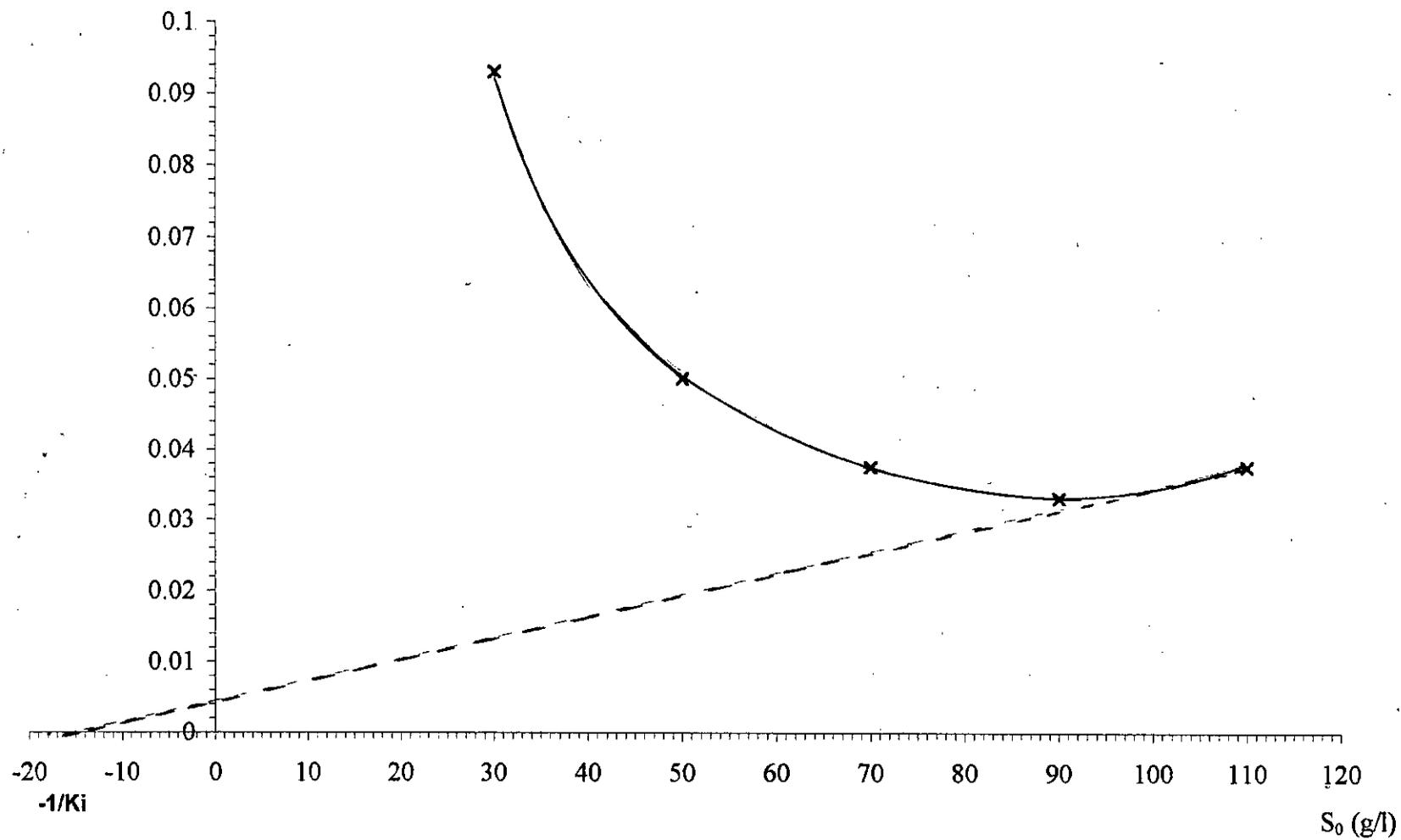


Figure 26 : Représentation de $1/V_i$ en fonction de S_0

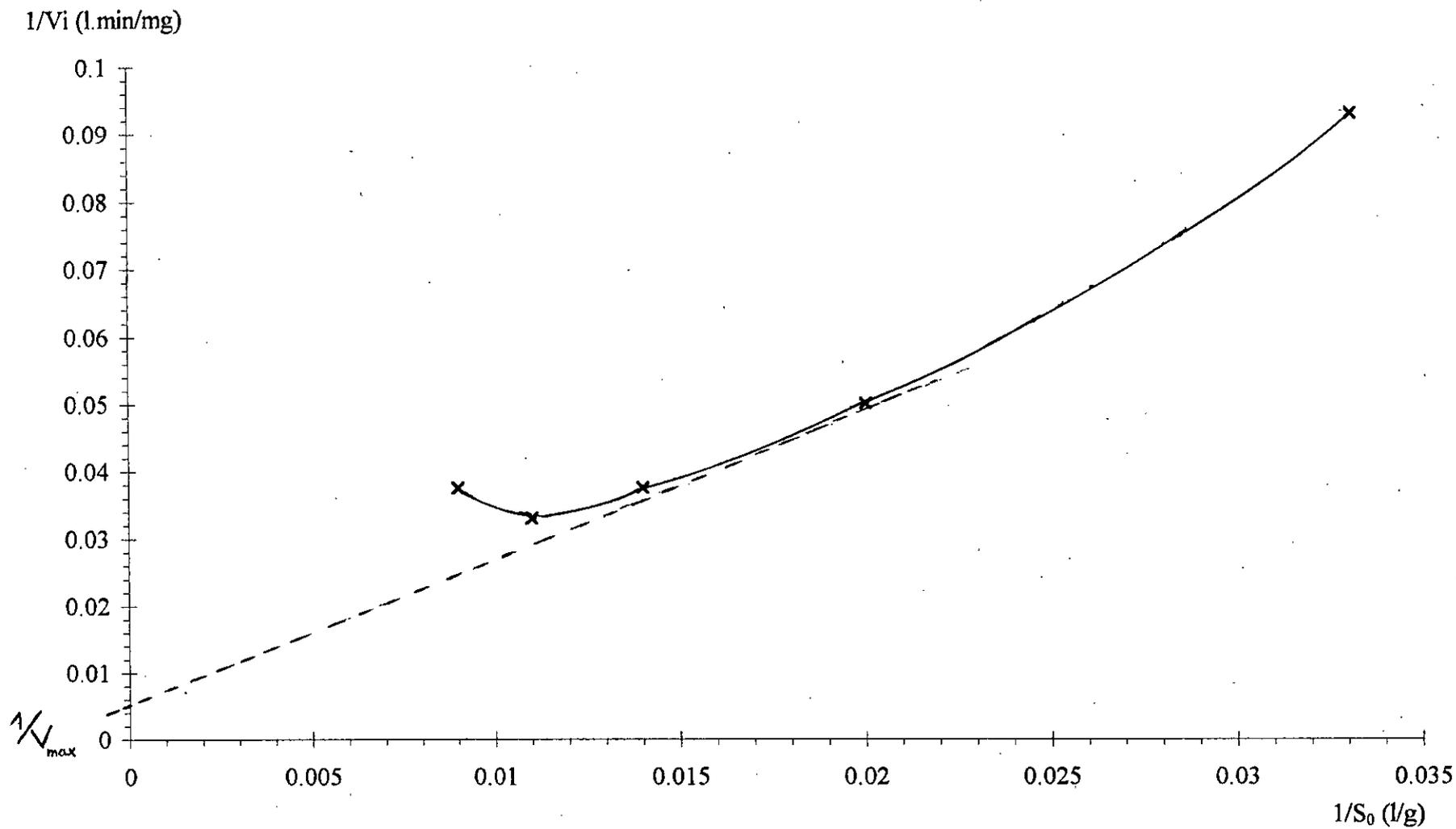


Figure 25 : Représentation selon LINE WEAVER et BURK d'une inhibition par substrat

3.3- Discussion:

Nous constatons d'après l'allure du graphe $1 / V_i = f (1 / S_0)$ présenté sur la figure (26), que la cinétique d'hydrolyse n'obéit pas à la loi de Michaelis Menten: ceci résulte de la présence d'inhibiteur dans notre substrat.

En effet, elle est du type hyperbole relevant ainsi l'existence d'une inhibition de la réaction d'hydrolyse par un excès de substrat. LEE et FAN [28] suggèrent qu'il existe deux sortes d'inhibiteurs de la cellulase à savoir : le cellobiose et le glucose.

Notre étude montre une inhibition de l'hydrolyse à partir d'une concentration en substrat égale à 110 g / l.

Toute fois, on peut calculer V_{max} par simple extrapolation.

$V_{max} = 0.166$ g / l.min qui est en concordance avec celle citée en bibliographie [35].

K_m ne peut être déterminé à cause de la présence d'inhibition compétitive, qui n'a pas pu être étudiée dans notre cas. En effet il a fallu suivre l'effet des deux inhibiteurs de la cellulose à savoir le glucose et le cellobiose sur le taux de saccharification, en suite les extraire par un système en continu, pour pouvoir enfin calculer la valeur de K_m . Ce qui n'a pas fait l'objet de notre étude.

D'autre part la présence du phénomène d'inhibition par le substrat nous ramène à déterminer la valeur de la constante d'inhibition K_i par extrapolation à partir du graphe donnant l'évolution de $1 / V_i = f (S_0)$ (figure 27).

La valeur ainsi obtenue est de l'ordre de $K_i = 0.060$ g / l. Cette valeur est assez élevée par rapport à celle citée en bibliographie [39] cela s'explique par la présence des substances dénaturantes responsables de la perte d'activité [39] de l'enzyme [ENGASSER et HORVATH, 1976] d'une part, et une faible affinité de l'enzyme pour le substrat à cause de la présence d'inhibiteur d'une autre part.

4- Conclusion:

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

- * La cinétique de l'hydrolyse n'obéit pas à la loi de Michaelis Menten.
- * La concentration d'enzyme optimale est de l'ordre de 5 g / l pour les conditions opératoires réalisées.
- * Une inhibition par le substrat avec une constante d'inhibition de l'ordre de $K_i = 0.06$ g / l.

Conclusion générale

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

- Caractérisation chimique du grignon;
- Prétraitement à la soude caustique;
- Essai d'hydrolyse enzymatique du rejet.

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

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

❖ Le prétraitement à la soude caustique entraîne des modifications considérables dans la composition chimique du grignon:

- diminution de la teneur en matière grasse qui est rentable pour l'hydrolyse enzymatique;
- la fraction perdue de cellulose brute correspond à celle convertie en sucres fermentescibles.

❖ L'hydrolyse enzymatique du grignon brut prétraité à la soude caustique aboutit au meilleur rendement de saccharification pour une concentration d'enzyme de 5 g/l.

La cinétique de l'hydrolyse n'obéit pas à la loi de Michaelis Menten, ceci est dû:

- à la complexité du substrat et du système enzymatique,
- à la sensibilité des cellulases à l'inhibition par les produits de l'hydrolyse qu'il faut éliminer en continu par les voies mécaniques (dialyse) ou biologiques (couplage avec une fermentation).

Sur un plan général, la technologie d'hydrolyse enzymatique fait apparaître les grands progrès accomplis ces dernières années en matière de valorisation des substrats ligno-cellulosiques dans le but de la production des sucres fermentescibles.

En vue d'améliorer le rendement de saccharification de la cellulose en glucose, il serait intéressant de coupler l'hydrolyse enzymatique à la technologie membranaire comme l'ultrafiltration pour la séparation des sucres de l'enzyme.

En tout état de cause, aucun des procédés expérimentés à ce jour n'est actuellement compétitif en dépit des perfectionnements réalisés (élimination en continu du glucose produit et le prétraitement du substrat). Des obstacles subsistent toujours empêchent ainsi la saccharification de la cellulose en glucose de se mener à terme à savoir:

- le coût de production trop élevé et la faible activité des cellulases connues à ce jour.
- Le coût élevé des prétraitements nécessaires pour rendre la cellulose entièrement dégradable.

Cependant la valorisation du grignon d'olive en sucres fermentescibles ne pourra s'effectuer dans le cadre d'un schéma général, néanmoins, nous recommandons vivement à nos chercheurs et laboratoires de se pencher sur les différents procédés de valorisation du grignon d'olive et plus principalement sur le procédé d'hydrolyse enzymatique qui s'avère intéressant du point de vue environnemental.

ANNEXE

ANNEXES 1

Dosage des protéines:

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

a)- Minéralisation:

La prise d'essai est de 2g. On ajoute le catalyseur puis 10 ml d' H_2SO_4 concentrée ou minéralisée par ébullition en chauffant d'abord doucement avec agitation, jusqu'à décoloration, poursuivre alors le chauffage pendant 2 heures.

b)- Distillation:

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

- Verser le contenu du matra dans le réservoir de distillation, ajouter quelques gouttes de phenolphtaline.

-Ouvrir le robinet puis rincer le réservoir.

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

- Ouvrir le robinet de vapeur et distiller pendant 5 mn.

- Enlever l'erlenmeyer et rincer l'extrémité du réfrigérant.

C)- Le titrage:

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

$$\% \text{ d'azote total} = (dV * 0.25 / Pe * 1000) * 100$$

V : volume de H_2SO_4 (N / 50) ajouté (ml)

Pe : prise d'essai

D : densité de l'échantillon à doser.

-Le pourcentage de protéine par la formule suivante :

$$\% \text{ de protéine} = \% \text{ d'azote total} * 6.25$$

ANNEXES 2

Dosage des sucres totaux:

Méthode de Dubois:

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

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

1.1- Réactifs:

- H_2SO_4 concentré
- Solution de phénol à 5 %
- Tube à essai
- Pipette de 5 ml
- Spectromètre.

1.2- Préparation de la courbe d'étalonnage:

Solution mère:

100 mg de glucose déshydratée dans 100 ml d'eau distillée

- Prendre 4 ml de la solution mère et diluer à 50 ml dans une fiole jaugée (1 ml contenait 50 microgrammes)
- Préparer des tubes à essai qui contiennent 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 et 0.8 ml de la solution / 50 ml correspondant aux concentrations suivantes 8 - 16 - 24 - 32 - 40 - 48 - 56 et 64 microgrammes.
- Compléter le volume des tubes à essai à 1 ml.
- Additionner 1 ml de la solution de phénol.
- Agiter, puis, additionner 5 ml d'acide sulfurique concentré laisser refroidir à la température ambiante pendant 30 minutes.
- Lire la densité optique à 490 nm.

ANNEXES 3

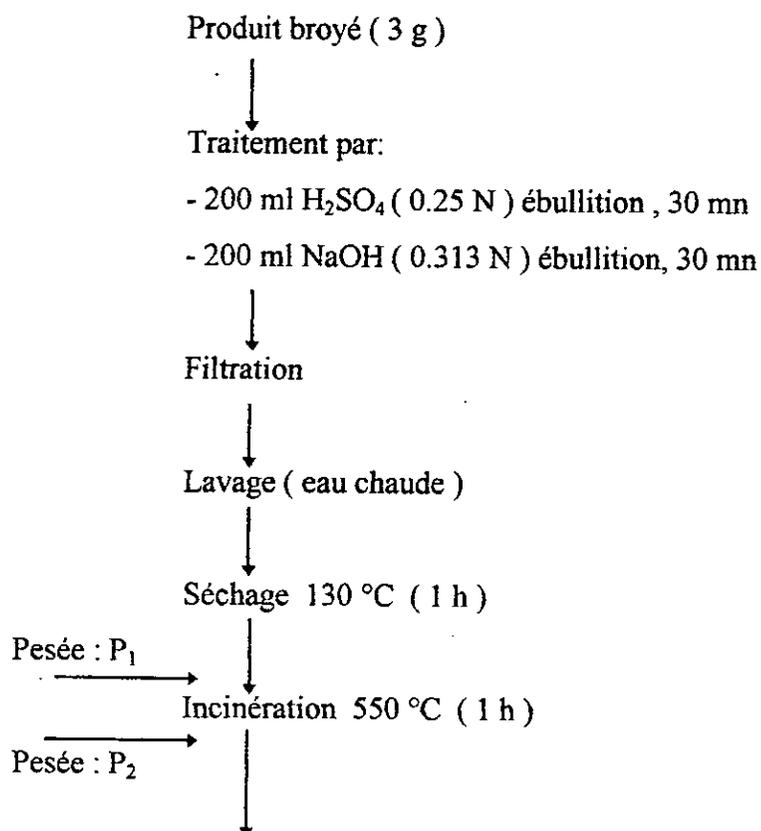
Méthode de Weende (1809)

Une des méthodes les plus anciennes de dosage de « l'insoluble cellulosique » est sans conteste celle mise au point par l'Institut Agronomique de Weende. Par définition et selon la norme ISO - AFNOR (NF V 03040, 1977) l'insoluble dit « cellulosique » correspond aux substances perdues lors de l'incinération du produit résistant aux attaques successives acide et alcaline.

Le produit broyé est soumis à une attaque par l'acide sulfurique 0.255 N à ébullition pendant 30 minutes.

La séparation du résidu peut s'effectuer par filtration sur toile de Nylon, sable de mer ou amiante du type dit pour creuset de Gooch. Le résidu est ensuite soumis à une attaque par la soude 0.313 N à ébullition pendant également 30 minutes. Après filtration, effectuée comme précédemment, le résidu est lavé à l'eau permutée chaude. L'insoluble obtenu est séché à 130 °C, pesé, puis incinéré à 550 °C.

Le schéma 1 résume le processus opératoire utilisé.



ANNEXES 4

Courbe D'étalonnage:

n° de tube	1	2	3	4	5	6	7	8
[S,T] µg/l	8	16	24	32	40	48	56	64
D.O	0.088	0.165	0.213	0.290	0.351	0.467	0.500	0.591

BIBLIOGRAPHIE

[1]- F. BOUSSAID

« Etude de la dénitrification in situ à l'aide de substrat cellulosique »

Thèse de doctorat; 1985

[2]- A. NEFZAoui

« Valorisation des résidus ligno-cellulosiques dans l'alimentation des ruminants par les traitements aux alcalis. Application aux grignons d'olive »

thèse de Doctorat 1985

[3]- A. MOURACHE et C. L. COSTES

« Hydrolases et dépolymérase, enzymes d'intérêts industriels »

édition Gauthier - Villars, Bordas 1985

[4]- R. SCRIBAN

« Biotechnologie » 1984

[5]- M. S. BENHABYLES

« Hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonneries »

thèse de Magister 1992

[6]- TALANTIKit

Projet de fin d'études 1983

[7]- A. BAKALEM

« Caractérisation et traitement d'un rejet d'huile : le grignon d'olive »

Projet de fin d'étude 1995

[8]- C. LAUDIGIE et G. DUPONT

« Principes des méthodes d'analyses »

Edition Doin 1985

[9]- U. PALLOTA et P. CAPENA

« Les sous produits de l'industrie oléicole, et leur utilisation »

Séminaire oléicole international FAO 1967.

[10]- P. E.PILET

« Les parois cellulaires »

Edition Masson, 1967

[11]- P. DUCROO

« Utilisation industrielle des enzymes »

Ind, Aliment. Agric; 1982.

[12]- J. P WOLF et A . KARLESKIND

« Manuel des corps gras » T 1

Edition technique et documentation Lavoisier 1992.

[13]- F. BENBESSI et S. BERTAL

« condition aux traitement des rejets liquides des huileries d'olives par ultrafiltration »

Projet de fin d'étude 1994.

[14]- D. SABOURAULT et A. M. BOUDEAUX

« Biochimie »

Editeur Harman 1974

[15]- C. COSTES

« Elément de biochimie structurale »

Edition Dunod, Université de Paris 1978.

[16]- Revue Biofutur

« Structure et fonction des enzymes » 1969

[17]- L. BELKACEM

« Valorisation et traitement des rejets des huileries en Algérie »
Séminaire 1992.

[18]- B. MONTIES

« Les polymères végétaux »
édition Gauthier - Villards, Bordas 1980

[19]- A. MARABET

« Influence d'un traitement chimique (NaOH ou Na₂CO₃) sur la composition chimique de la digestibilité in vitro d'un résidu lignocellulosique « grignon d'olive »
Projet de fin d'étude 1984

[20]- ABERKANE

« Valorisation alimentaire de grignon d'olive chez le ruminant »
Projet de fin d'étude; 1990

[21]- T. ABI

« Valeur alimentaire de la paille de blé surcomplémenté »
Projet de fin d'étude; 1993

[22]- Memento technique de microbiologie

Edition: LARPENT J. P, Lavoisier; 1990

[23]- Revue Biofutur

« Les polysaccharides » 1986

[24]- D. J. FIOX et P. GRAY

« Comparaison of alcali steam acid pretreatment of lignocellulos materials to increase enzymatic susceptibilty Evaluation under optimised pretreatment conditions » 1989

[25]- L. VALLANDER et K / E / L ERICKSEN

« Production of ethanol from cellulosics materiels »

[26]- M. GHARPURAY et L. T FAN

« Structura modification of lignocellulosics by presentement to enhance enzymatic hydrolisics »
1984

[27]- H. THOMAS et F. CHARLES

« Technologies Advances for continuous compression Milling pretreatment of lignocellulosique
for enzymatic »

[28]- A. V GUSTAKOV et P. SMITSYM

« Kinetics of the enzymatic hydrolisis of cellulase, a mathematical model for a batch reactor
process »; 1984

[29]- H. S SHIN et D. Y. RYU DEWEY

« Adsorption of cellulose » 1982

[30]- C. VACCARINO et G / LAGANA

« Amélioration de la valeur nutritionnelle au carbonate »

[31]- L. VALLABENDER et K. E. ERICSON

« Enzymatic saccharification of preteated Wheat Straw » 1983

[32]- Yong-HYUN LEE et L. T. FAN

« Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose : Analysis of Extended Hydrolysis
Times » 1983.

[33]- L. T. FAN

« Kinetic studies of Enzymatic Hydrolysis of insoluble cellulose : Analysis of the initial
Rates » 1982.

[34]- C. ARGENSON

« Le grignon d'olives, carburant industriel : ça marche »

[35]- L. P. Walker, D.B. Wilson

« Fragmentation of cellulose by the major thermonospora fusca cellulases, trichoderma reesei and their Mixtures »; 1992.

[36]- M. TH. TOLLIER, A. M. RIQUEI

« Dosage des polyosides »