

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur et De La Recherche Scientifique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE D'ALGER

**DEPARTEMENT GENIE DE L'ENVIRONNEMENT
LABORATOIRE DES BIOTECHNOLOGIES
ENVIRONNEMENTALES ET DE GENIE DES PROCÉDES**

PROJET DE FIN D'ETUDES

Pour l'obtention du diplôme
D'Ingénieur d'Etat en Génie de l'Environnement

Thème

المدرسة الوطنية المتعددة التخصصات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

**Etude de l'influence d'un champ électrique
sur une hydrolyse enzymatique du grignon
d'olive**

Proposé et dirigé par :
Mme N.ABDI

Réalisé par :
RAHIM SAMIR

Devant le jury :

Président : Pr.N.mameri

Promoteur : N.ABDI C.C

Examineurs :

F. Mou halbi. Dr

H. Lounici C.C

M. Derouiche Dr .Ing .

J.Arrar.C.C

L.Benhables.Dr

Promotion 2002/2003

E.N.P, 10, AVENUE HASSEN BADI. BP182. ELHARRACH. ALGER

ملخص:

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير حقل كهربائي على الاماهة الانزيمية للنفقات الناتجة عن انتاج زيت زيت.

قمنا فى البداية بتعين المحتوى الكهربائي فى هذه النفقات و دراسة تأثير الحقل الكهربائي على التفاعل الانزيمي مفاعل بيولوجي.

الكلمات الجوهرية:

اماهة انزيمية الينوسيتيلوز, النفقات الصلبة لزيت الزيتون, مفاعل بيولوجي, الحقل الكهربائي.

Résumé :

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

La caractérisation chimique du grignon d'olive a été déterminée et l'influence du champ électrique sur l'hydrolyse enzymatique a été étudiée et optimisée.

Mots clés :

Hydrolyse enzymatique, champ électrique, matériau lignocellulosique, caractérisation chimique.

abstract:

the purpose of this work, is the study of the influence a electric field an enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material :solid residues of olive oil factories.

the chemical characterization of solid residues of olive oil has been determined and the influence of the electric field on enzymatic hydrolysis has been studied and optimized.

Key words :

Enzymatic hydrolysis, lignocellulose, olive-oil cake, cellulose, membrane bioreactor.

SOMMAIRE

| | |
|----------------------|---|
| I- INTRODUCTION..... | 1 |
|----------------------|---|

II- PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

CHAPITRE I : Généralités sur l'olive et ses sous-produits

| | |
|---|----|
| I-1/ Origine et production | 5 |
| I-2/ L'oléiculture et la production oléicole en Algérie..... | 5 |
| I-3/Technologie de production d'huile d'olive | 7 |
| I-4/ Composition de l'olive | 9 |
| I-5/ Définition des sous-produits de l'oléiculture | 10 |
| I-6/ Composition chimique des grignons d'olive | 10 |
| I-7/ Estimation quantitative des rejets d'huilerie et impact sur l'environnement..... | 11 |
| I-8/ Valorisation des sous produits de l'oléiculture..... | 11 |
| a) valorisation des coques | 11 |
| b) Valorisation des grignons..... | 11 |
| c) Valorisation des eaux de végétation..... | 12 |

CHAPITRE II : Les résidus ligno- cellulosiques: Composition-Structure-Propriétés

| | |
|--|----|
| II-1/Composition des résidus lignocellulosique | 14 |
| II.1.1/ La cellulose..... | 14 |
| II-1-2/ Les Hémicelluloses | 14 |
| II.1.3/ La lignine | 14 |
| II-2/ Nature de la résistance structurale des constituants pariétaux | 15 |
| II-2-1/Effet de la structure de la cellulose sur l'hydrolyse..... | 15 |
| II-2-2/ Effet de la lignine sur l'hydrolyse | 16 |

CHAPITRE III : Les enzymes cellulosiques

| | |
|--|----|
| III-1/ Définition..... | 18 |
| II-2/ Classification des enzymes..... | 18 |
| III-2-1/ Les cellulases..... | 18 |
| III-2-2/ Conception actuelle de l'action de la cellulase | 19 |
| III -3/ Régulation enzymatique..... | 21 |

CHAPITRE IV : Les prétraitements

| | |
|---|----|
| IV-1/ Différentes prétraitements | 23 |
| IV-1-1/ Prétraitements physiques..... | 23 |
| 1-1/Le broyage..... | 23 |
| 1-2/Pyrolyse..... | 23 |
| 1-3/Irradiation a haute énergie..... | 23 |
| 1-4/Prétraitement a la vapeur | 23 |
| IV-1-2/ Prétraitements chimiques | 24 |
| 2-1/Prétraitements alcalins..... | 24 |
| 2-2/Prétraitements acides..... | 24 |
| 2-3/Solvants de la cellulose..... | 24 |
| IV-1-3/ Prétraitements biologiques..... | 25 |

CHAPITRE V : Etude de l'hydrolyse enzymatique dans un réacteur discontinu couplé à un champ électrique

| | |
|-----------------------------------|----|
| VI-1/Etudes antérieures | 27 |
| VI-2/Développement théorique..... | 28 |

III- PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : Caractérisation et prétraitements des grignons d'olive

| | |
|--|----|
| I-1/ Mode de préparation du substrat | 32 |
| I-1-1/ Matériels et méthodes | 32 |

| | |
|--|----|
| I-2/ Détermination des caractéristiques chimiques des grignons d'olive | 32 |
| a) Humidité | 32 |
| b) Matière sèche | 32 |
| c) Cendres Totales..... | 32 |
| d) Matieres Grasses | 32 |
| e) Matières Azotées Totales | 33 |
| f) Cellulose brute | 33 |
| g) Composés pariétaux | 33 |
| I-3/ Résultats et interprétations | 33 |
| I-4/ Les prétraitements des grignons d'olive | 34 |
| I-4-1/ Matériels et Méthodes | 34 |

CHAPITRE II : Hydrolyse enzymatique couplée à un champ électrique

| | |
|--|----|
| II-1/Introduction | 37 |
| II-2 / Matériels, Mode opératoire et Méthodes d'analyses | 37 |
| II-2-1/Matériels | 37 |
| II-2-2/ Mode opératoire et Méthodes d'analyses | 39 |
| II-3/Résultats et interprétations | 39 |
| II-3-1/Résultats | 39 |
| CONCLUSION | 52 |
| BIBLIOGRAPHIE | 53 |

Dédicaces

• Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents.

- Mes chères sœurs et frères.
- A toute ma grande famille.
- Et à tous mes amis (Tarbichi, Said...)
- Et enfin à ceux et celles qui m'ont aidé et soutenu.
- Sans oublier la femme de ma vie
- Et à la mémoire des gens qui me sont chers.

Remerciements

Je tiens tous d'abord, à exprimer à M^R H.LOUNICI et Mme N.ABDI sous la direction desquels ce projet à été mené, ma profonde gratitude pour leur précieux concours, les conseils qu'ils n'ont cessé de me prodiguer et l'intérêt constant qu'ils ont porté à mon travail.

Je tiens à remercier aussi M^R le Pr. N. MAMERI pour m'avoir accueilli dans son laboratoire des Biotechnologies et d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de mon mémoire de fin d'études.

J'exprime ma profonde considération à tous les membres de jury qui ont bien voulu m'honorer de leur présence et évaluer cette modeste contribution scientifique.

Je ne saurai oublier mes camarades de génie mécanique, génie industriel ainsi que ceux du département de génie de l'environnement pour l'aide qu'ils m'ont souvent apportée.

Mais je tiens à citer quelques-uns :

Saïd, Djamel, Lila, Assira, Amina, Dalila,etc. mon ami M. Mokdad chercheur à l'O.N.A.B pour les analyses que j'ai effectué au sein de son laboratoire, Mahfoud, J.Arrar chef de département de génie de l'environnement.

Enfin, que tous les enseignants qui ont contribué à ma formation, tant du primaire, du secondaire et du supérieur, trouvent ici l'expression de mon éternelle reconnaissance.

ABREVIATIONS

| | |
|-------------------|-------------------------|
| U : | potentiel électrique |
| V : | volte |
| M.S : | Matière sèche |
| C.T : | Cendres totales |
| M.A.T : | Matières azotées |
| M.G : | Matières grasses |
| C.B : | Cellulose brute |
| N.D.F : | Neutral detergent fiber |
| A.D.F : | Acid detergent fiber |
| A.D.L : | Acid detergent lignine |
| S.T : | Sucres totaux |
| Ca ⁺ : | Calcium |
| Na ⁺ : | Sodium |
| K : | Potassium |
| m ³ : | mètre au cube |
| Kg : | Kilogramme |
| L : | Litre |
| µl : | microlitre |
| E : | Enzyme |
| S : | Substrat |
| ml : | millilitre |
| g : | gramme |
| t : | temps |
| s : | second |
| h : | heure |
| µg : | milli gramme |
| T : | température |
| pH : | potentiel d'hydrogène |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : répartition de la production oléicole | 5 |
| Tableau 2 : production d'huile d'olive par différentes wilayates d'Algérie pour l'année 96/97..... | 6 |
| Tableau 3 : répartition des plantations de la production nationale et trituration des olives à l'huile | 7 |
| Tableau 4 : composition chimique moyenne de l'olive en % de la matière sèche | 9 |
| Tableau 5 : composition chimique du grignon d'olive..... | 11 |
| Tableau 6 : les micro-organismes sources importantes de cellulase..... | 19 |
| Tableau 7 : les méthodes de prétraitement utilisées..... | 23 |
| Tableau 8 : caractéristiques chimiques des grignons d'olive en % de la matière sèche | 33 |
| Tableau 9.a : les teneurs éléments minéraux en % de M.S | 34 |
| Tableau 9.b : principales caractéristiques du substrat expérimentale en % de M.S | 34 |
| Tableau 10 : les résultats de l'hydrolyse enzymatique sans l'application du champ électrique (un substrat traité) | 40 |
| Tableau 11 : les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec l'application du champ électrique $U = 0.1$ V(un substrat traité) | 40 |
| Tableau 12 : les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec l'application du champ électrique $U = 0.1$ V(substrat non traité) | 41 |
| Tableau 13 : les résultats de l'hydrolyse enzymatique sans l'application du champ électrique pour la deuxième enzyme | 45 |
| Tableau 14 : les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec l'application du champ électrique $U = 0.09$ V pour la deuxième enzyme | 45 |
| Tableau 15 : les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec l'application du champ électrique $U = 0.2$ V pour la deuxième enzyme | 46 |
| Tableau 16 : les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec l'application du champ électrique $U = 0.15$ V pour la deuxième enzyme | 46 |
| Tableau 17 : les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec l'application du champ électrique $U = 0.05$ V pour la deuxième enzyme | 47 |
| Tableau 18 : les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec l'application du champ électrique $U = 0.01$ V pour la deuxième enzyme | 47 |

المركز الوطني للدراسات والبحوث
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

Introduction générale

Introduction générale

La diminution des ressources en fuels fossils et la croissance de leur demande ont mené à la recherche d'une ressource d'énergie alternative ; la biomasse lignocellulosique , constituée essentiellement par des résidus agricoles (pailles de céréales, tiges de maïs), certains sous produits de l'industrie agro alimentaire (pulpes , bagasse , grignon d'olive), les fourrages et bois non-exploités pour leurs abondances et leurs renouvelabilités, ils peuvent constituer une matière première énergétique intéressante [1].

La cellulose constituant majeur de la biomasse lignocellulosique peut être valorisée en tant que polymère dans l'industrie après hydrolyse par voie chimique ou enzymatique et fournir du glucose qui constitue une matière première importante pour l'industrie chimique et agro-alimentaire. Les produits lignocellulosiques peuvent être utilisés par combustion directe, mais également par fermentation de la fraction glucidique en éthanol.

En Algérie, pour des raisons techniques et surtout économiques et mis a part son utilisation dans l'alimentation des ruminants, la biomasse lignocellulosique ne fait l'objet d'aucune valorisation. Néanmoins, travaux [8,35] ont été effectués a l'échelle laboratoire et pilote permettant de valoriser cette réserve importante par un procédé biologique (hydrolyse enzymatique).

Les techniques existantes actuellement sont appliquées pour la valorisation d'un matériel lignocellulosique sont :

- 1) l'hydrolyse enzymatique.
- 2) L'hydrolyse chimique.

L'objet de ce présent travail consiste à étudier un procédé de valorisation d'une matière lignocellulosique « le grignon d'olive » par un couplage de l'hydrolyse enzymatique et l'application d'un champ électrique.

De ce fait , notre travail sera basé sur les étapes suivantes ;

La première étape de notre travail sera consacré à une étude bibliographique relative à l'hydrolyse des polysaccharides en présence d'enzymes.

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

La troisième étape sera consacrée à l'étude de l'influence du champ électrique sur la cinétique d'hydrolyse du résidu ligno-cellulosique.

La quatrième étape sera consacrée à l'optimisation de l'intensité du champ électrique appliqué à l'hydrolyse et une étude comparative des deux voie suivantes :

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

La seconde électro-biologique : consiste en une application d'un champ électrique à l'hydrolyse enzymatique.



PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Généralités sur l'olive et ses sous-produits

I-1/ Origine et production :

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

L'importance de la production oléicole mondiale peut être illustrée par les 600 millions d'arbres qui occupent 7 millions d'hectares et produisent annuellement 8,4 millions de tonnes d'olives [2]. Les pays les plus producteurs et les plus consommateurs sont l'Italie, l'Espagne et la Grèce qui gouvernent environ 80% de la production mondiale [3].

Le tableau (1), donne la répartition de la production oléicole des trois pays suscités :

TABLEAU (1) : Répartition de la production oléicole [3].

| | |
|---------|----------------------------------|
| Espagne | 32 % de la production mondiale |
| | 41 % de la production européenne |
| Italie | 28 % de la production mondiale |
| | 35 % de la production européenne |
| Grèce | 17 % de la production mondiale |
| | 21 % de la production européenne |

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

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

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

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

Un exemple de la production nationale en huile d'olive pour l'année 96/97 est représenté dans le tableau (2) [5].

TABLEAU (2) : Production d'huile d'olive par différentes Wilayates d'Algérie pour l'année 96/97[5].

| Wilayates | Production réalisée (Quintaux/ha) |
|--------------------|--------------------------------------|
| Tlemcen | 29891 |
| Sidi Bel Abbess | 480 |
| Ain Timoucliente | 2200 |
| Saida | 4000 |
| Oran | 5800 |
| Mascara | 20000 |
| Médéa | 12978 |
| Chlef | 5200 |
| Ain Defla | 5500 |
| Blida | 9500 |
| Tipaza | 12451 |
| Boumerdes | 91700 |
| Tizi-Ouzou | 234457 |
| Bouira | 164392 |
| Bejaia | 559000 |
| Jijel | 198881 |
| Mila | 15850 |
| Constantine | 1173 |
| M'sila | 1950 |
| Batna | 163662 |
| Setif | 211155 |
| Bordj Bou Arreridj | 60000 |
| Khenchela | 849 |
| Tébessa | 1035 |
| Guelma | 41524 |
| Souk Ahras | 8370 |
| Annaba | 2824 |
| El Tarf | 8280 |
| Skikda | 75000 |

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

TABLEAU (3) : répartition des plantations, de la production nationale et trituration des olives à huile (RAMOS et al 1997)

| REGION | SURFACE (Ha) | TRITURATION DES OLIVES A L'HUILE | HUILE | GRIGNON | REPARTITION PAR SYSTEME D'EXTRACTION |
|--------|--------------|----------------------------------|-------|---------|--------------------------------------|
| | | OFFICES PRIVES TOTALE | (T) | (T) | CENTRIFUGATION SUPER-PRESSE CASSIQUE |
| 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% |

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

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

Le système de production d'huile d'olive comprend en général cinq opérations qui sont représentées sur le schéma (1) :

REGI

11.58

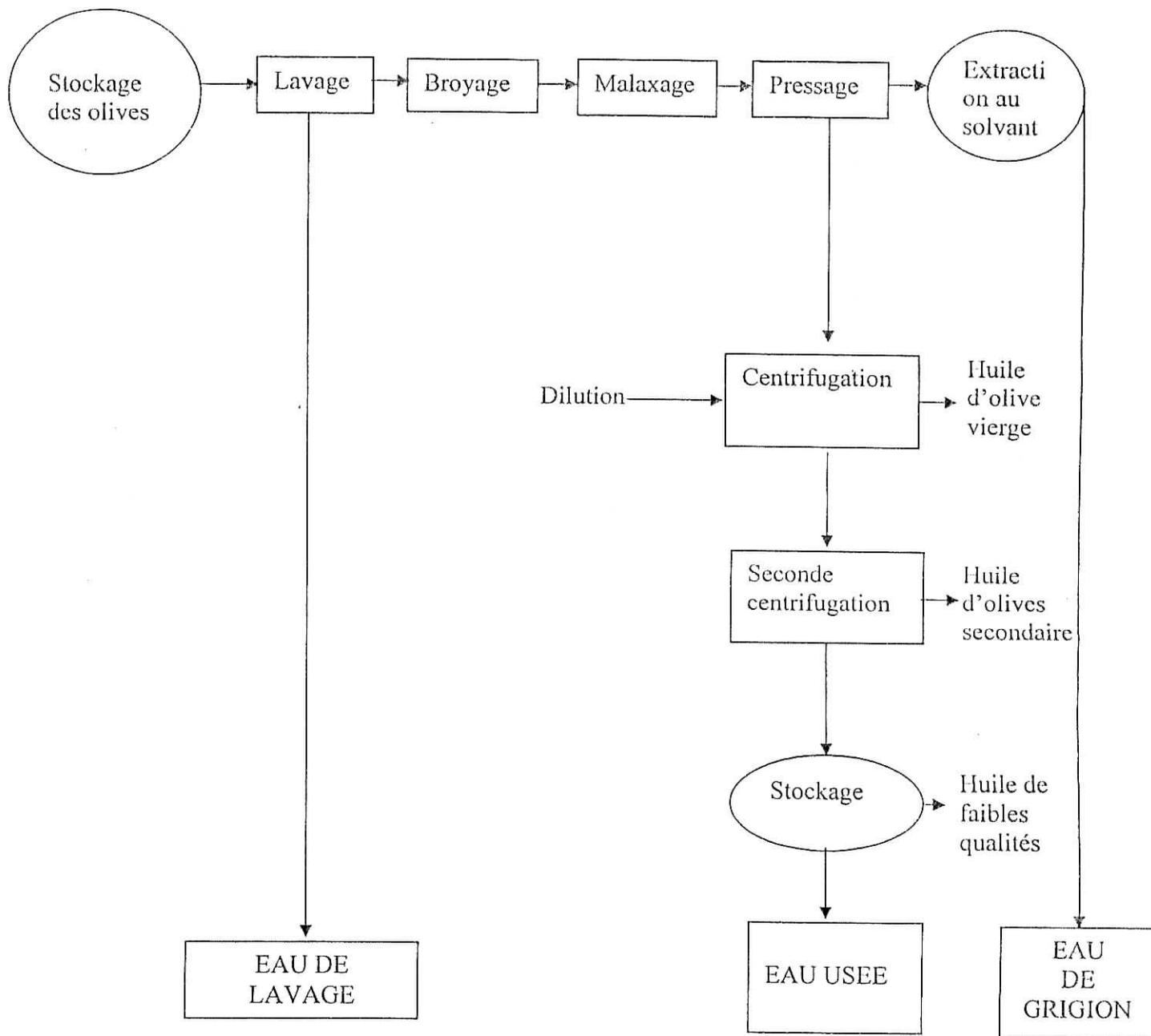


Figure (1) : schéma des Processus de production d'huile d'olive [6].

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

I-4/ Composition de l'olive

L'olivier est une drupe , sa composition physique est indiquée à la figure (1) :

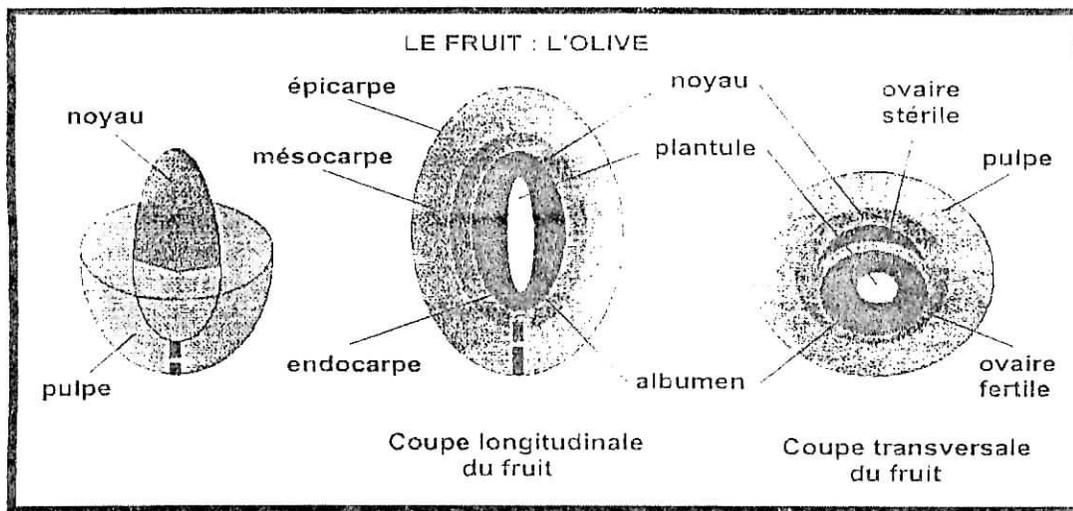


Figure (2): Composition physique d'olive [3].

La composition chimique des différents constituants de l'olive est très variée ; le tableau (4) présente la composition chimique moyenne de l'olive en fonction des différentes parties anatomiques :

Tableau (4) : Composition chimique moyenne de l'olive en % de la matière sèche [7]

| Constituant | Matières grasses | Matières Azotées Totales | Cellulose | Cendres Totales |
|----------------------|------------------|--------------------------|-----------|-----------------|
| Epicarpe ou membrane | 3,40 | 9,80 | 2,40 | 1,60 |
| Mésocarpe ou pulpe | 51,80 | 9,60 | 12,00 | 2,30 |
| Endocarpe | 0,80 | 1,30 | 74,10 | 1,20 |

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

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

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

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

NEFZAOUI *et al* [8] proposent la nomenclature suivante :

1. **Le grignon brut** : c'est un résidu de la première extraction de l'huile par pression de l'olive entière. Il contient des teneurs élevées en eau (24%) et en huile (3%), ce qui favorise son altération rapide lorsqu'il est laissé à l'air libre.
2. **le grignon épuisé** : c'est le résidu obtenu après déshuilage ou épuisement du grignon brut Par un solvant (généralement l'hexane).
3. **le grignon tamisé** : il résulte de la séparation partielle des débris de coques et de la pulpe par ventilation. Il est dit gras si son huile n'est pas extraite par un solvant et dégraissé ou épuisé si son huile est extraite par un solvant.
4. **la pulpe de l'olive** : c'est la pâte obtenue lorsque le noyau a été séparé avant l'extraction de l'huile, elle est riche en eau (60%) et de conservation très difficile.
5. **les margines** : c'est un résidu aqueux séparé de l'huile par centrifugation ou sédimentation, il représente 40 % du volume des olives traitées.

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

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

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

On peut retenir les données générales représentées sur le tableau (5) :

| Composé | Grignon brut | Grignon épuisé | Pulpe | Margines |
|------------------|--------------|----------------|-------|----------|
| H ₂ O | 24% | 1% | 60% | 85% |
| Huile | 3% | 0% | 1% | 0% |
| Protéines | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Glucides | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Minéraux | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Cellulose | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Lignine | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Chlorophylle | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Caroténoïdes | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Vitamines | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Acides gras | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Acides aminés | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Alcaloïdes | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Enzymes | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Antioxydants | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Phénols | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Stéroïdes | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Alcaloïdes | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Enzymes | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Antioxydants | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Phénols | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Stéroïdes | 1% | 1% | 1% | 1% |

Tableau (5) : Composition chimique du grignon d'olive [9].

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

I-7/ Estimation quantitative des rejets d'huilerie et impact sur l'environnement:

Le procédé classique d'extraction d'huile d'olive par pression, produit en moyenne, pour une quantité de 100 Kg d'olive: 20 Kg d'huile, 40 Kg de grignon, et 40Kg de margines [11]. Dans la région de Kabylie, la principale région productrice de l'huile en Algérie, les rejets solides et liquides des huileries sont estimés en tonnage et en volume à 48.000 Tonnes de grignons et 48.000 m³ d'eau de végétation (margine) rejetés directement dans la nature. Ces produits occasionnent de graves détérioration à l'environnement.

En effet, les eaux de végétation contaminent les eaux souterraines par simple infiltration . 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 [12].

I-8/ 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 a des fins industriels.

a) valorisation des coques:

La forte valeur énergétique des coques issues du décorticage permet leurs 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 [2,11].

b) Valorisation des grignons:

Les grignons d'olives mélangés à des fourrages sont utilisés comme aliment pour le bétail. Ils sont également utilisés dans la production continue du furfural, et dans la production d'alcool par saccharification, toutefois il faut noter que ces procédés ne semblent pas être avantageux sur le plan économique. Les recherches se poursuivent dans le but d'amélioration. Aux U.S.A., les grignons d'olives sont principalement utilisés pour le nettoyage de certaines surfaces métalliques par sablage [8,20].

e) 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].

10/11/11

10/11/11

10/11/11
10/11/11
10/11/11
10/11/11

10/11/11

Chapitre II

Les résidus ligno- cellulosiques: Composition-Structure-Propriétés

91

II-1/Composition des résidus lignocellulosique :

La biomasse ligno-cellulosique est constituée essentiellement par les parois végétales des plantes récoltées.

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

II.1.1/ La cellulose:

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

La cellulose est un polysaccharide de la série β -D glucane. C'est une macromolécule linéaire constituée d'unités anhydroglucose liées entre elles par des liaisons glucosidiques du type β -(1 \rightarrow 4), sous la configuration chaise (figure 3). Son degré de polymérisation est de l'ordre de 10.000 unités par molécule. Elle est insoluble dans l'eau mais soluble dans la liqueur de Schweitzer [2,24].

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

II-1-2/ Les Hemicelluloses :

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

Les hémicelluloses sont des polysaccharides, courts, branchés et facilement hydrolysables. Ils existent sous forme d'homo polysaccharides comme les β glucanes, mais plus souvent sous forme d'hétéro-polysaccharides comme le Larabino-D-Glucurono-D-Xylane.

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

II.1.3/ La lignine:

Les lignines sont des polymères tridimensionnels d'origine phénolique, formées par la copolymérisation de 3 alcools phényl-propanoïques: l'alcool coumarilique, l'alcool coniferylque et l'alcool sinapylique figure (3) [10]

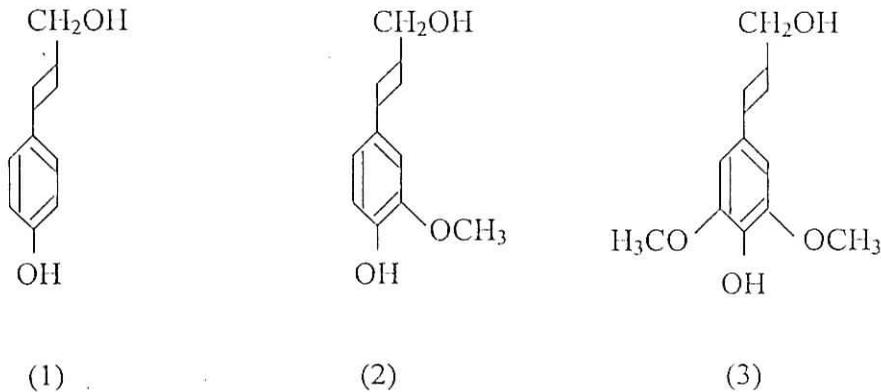


Figure (3) : Configuration des alcools phényl- propaneiques .

La proportion de ces trois alcools varie suivant l'espèce végétale, le tissu dans la plante et la localisation dans la paroi végétale. Les liaisons qui relient les unités monomériques sont extrêmement variées, il s'agit dans tous les cas de liaisons stables, et non hydrolysables.

Reste à noter que les lignines sont rapidement attaquées par les chlorures, les hypochlorites et d'autres oxydants tels que l'acide azotique, l'acide chromique et le permanganate de potassium [10].

II-2/ Nature de la résistance structurale des constituants pariétaux :

II-2-1/Effet de la structure de la cellulose sur l'hydrolyse :

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

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

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

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

La combinaison partielle de la lignine à la cellulose cristalline existant dans la biomasse lignocellulosique acquiert une résistance biologique très élevée. Les micro-organismes capables de dégrader la cellulose perdent cette capacité par la présence de la lignine. La relation entre le degré de délignification et la vitesse d'hydrolyse est représentée sur la figure (4) ;

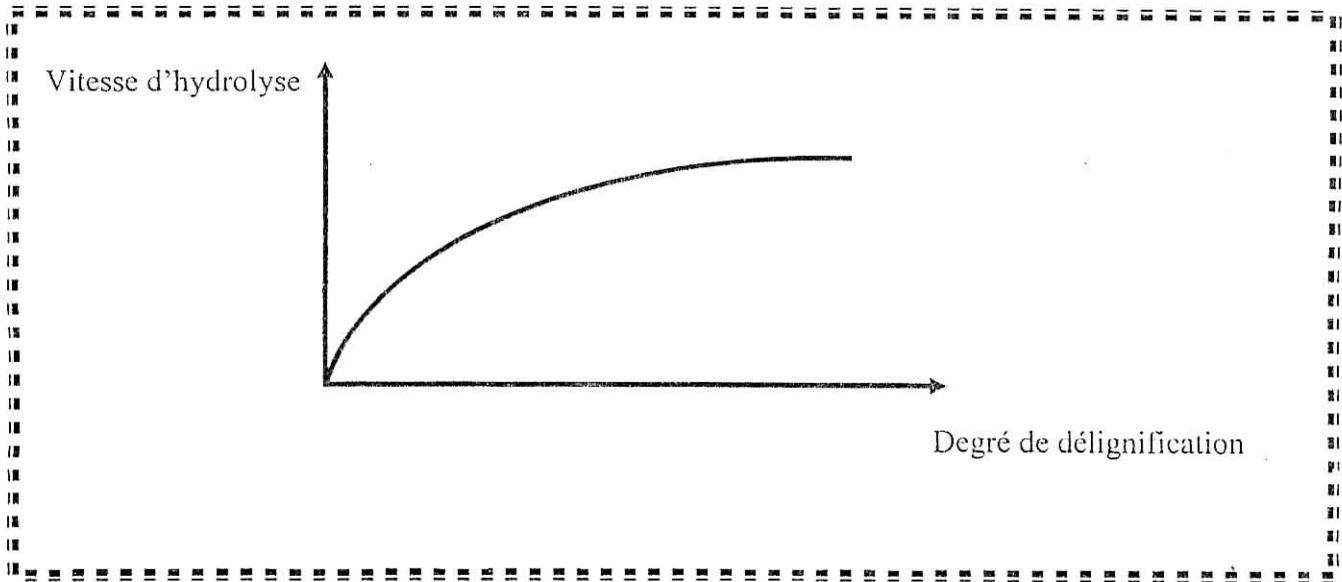


Figure (4) : effet du degré de délignification sur la vitesse d'hydrolyse [22].

FAN [39], on observe que la vitesse d'hydrolyse de la paille de blé augmente considérablement avec le degré de délignification, jusqu'à ce que celui-ci atteigne 50% ; au-delà de cette valeur, la vitesse augmente peu.

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

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

Chapitre III

Les enzymes celluloliques

III-1/ Définition

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

III-2/ Classification des enzymes:

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

Les oxydo-reductases: Elles catalysent les réactions d'oxydoréduction , quelque soit le mécanisme.

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

Les hydrolases: Elles catalysent la rupture d'une liaison par fixation d'une molécule d'eau. c'est la classe qui contient la plupart des enzymes utilisées en industrie .

Les liases: Elles catalysent des réactions qui permettent les déplacements d'un groupement sur le substrat avec apparition d'une double liaison.

Les isomérases: Elles catalysent les réactions du type $A \rightleftharpoons B$

les lipases : Elles catalysent l'union de deux molécules en utilisant l'énergie fournie par la dégradation de l'A.T.P [2] .

III-2-1/ Les cellulases:

Les cellulases sont des enzymes qui appartiennent à la classe des hydrolases, elles dégradent la cellulose en glucose. Les principales sources de cellulose sont représentées au tableau (6). Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressé à l'enzyme cellulolytique sécrétée par le champignon de pourriture blanche : le "Trichoderma-reesei".

Le Trichoderma-réesei est un ascomycète qui présente 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 cellulose.

Tableau (6): les micro-organismes sources importantes de cellulases [34].

| Fungi | Bacterie |
|-------------------------------|---------------------------------|
| - Trichoderma Koningii | - Ruminococcus albus |
| - Trichoderma Viride | - Micromonospora ruminantium |
| - Trichoderma reesei | - Rummococcus flave facieus |
| - Chaetomium indicum | - Bactenode ruminantium |
| - Chatoemum Cellulotium | - Clostridium cellobiomorus |
| - Murothecium Verrucana | - Clostridium thermocellulasium |
| - Aspergillus niger | - Bacillus Subtilus |
| - Rhizopus stolonifer | - Arthrobacter luteus |
| - Sporotrichum ThermopHile | - Micro polyspora |
| - Sporotrichum Pulverichentum | - Clostridium Themocellum |
| - Penecillium rubrum | - Cellulomonas U.D.A |
| - Penecillium janthinellum | - Cellvibrio fulvus |
| - Polyponus versicolor | - Cellabno gibvus |
| - Basidiomycetes opecies | - SporocytopHaga mycoccoides |
| - Helmutos poinum cylops | - Actinomyces sp. |
| - Fusarium solani | - Proactinomyces sp. |
| - Fusarium oxysporum | - Nocardia sp. |
| - Stachybotys atra | |
| - Talaromyces emersonu | |
| - SchizopHylum commune | |
| - Thennonos pora curvata | |

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

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

III-2-2/ Conception actuelle de l'action de la cellulase :

De nombreux chercheurs ont étudié la dégradation enzymatique de la cellulose, mais malgré leurs efforts, ce mécanisme est encore imparfaitement connu. La figure (5) ; schématise la conception actuelle du mode d'action des différentes activités enzymatiques sur la cellulose [34]

Le mode d'action est décrit par *J.POURQUIE* : est cité dans [39] :

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

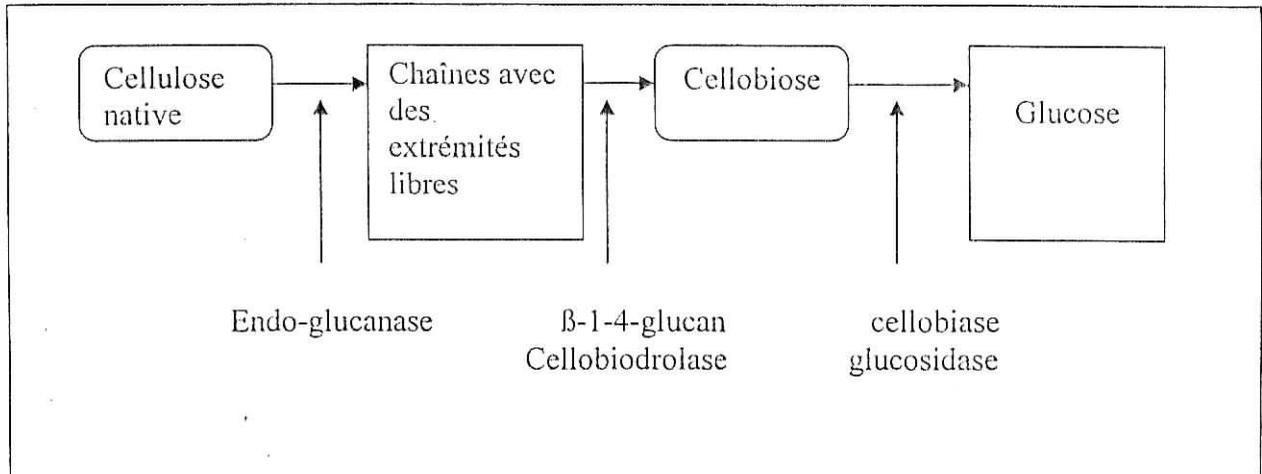


Figure (5) : conception actuelle de l'activité cellulolytique [34].

Régions Cristallines Régions amorphes

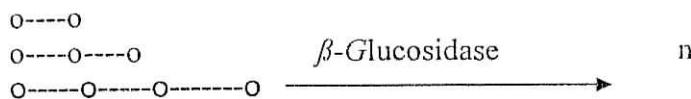
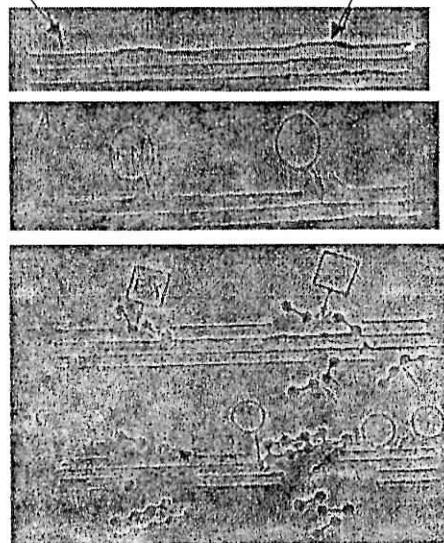


Figure (6) : Mécanisme d'action des cellulases sur la fibrille de cellulose [1].

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

III -3/ Régulation enzymatique:

L'activité du complexe cellulosique est soumise à une régulation précise à travers les inhibitions subies par chacun des constituants. Les B-glucosidases sont très fortement inhibés par la gluconolactone, chez le *T. 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 exo-glucanases sont inhibées par la cellubionolactone et le gluconolactone. Le glucose est aussi inhibiteur, mais c'est le cellobiose, inhibiteur compétitif, qui influe le plus sur cette activité.

h3p0

h3p1

h3p2

h3p3

h3p4

h3p5

h3p6

h3p7

h3p8

Chapitre IV

Les prétraitements

94

Les hémicelluloses (polymères de pentoses et d'hexoses), les lignines (macromolécules poly phénoliques) et la cellulose (polymère linéaire d'unités β -D-glucose) sont les constituants majeurs des celluloses à l'hydrolyse enzymatique. La résistance de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique s'explique d'une part par la présence d'une matrice formée par les hémicelluloses et la lignine qui entoure la cellulose. Cet ensemble constituant un système de hauts polymères étroitement imbriqués ; D'autre part la structure hautement ordonnée de la cellulose lui confère une certaine cristallinité.

L'accessibilité de la cellulose aux cellulases dépend des propriétés des surfaces libres, des liaisons entre les divers constituants, de la taille des particules, tandis que sa dégradation est liée à son degré de cristallinité et la solubilisation des hémicelluloses. L'accessibilité peut être augmentée par des traitements, qui se subdivisent en trois catégories [23] :

- Des traitements physiques.
- Des traitements chimiques.
- Des traitements biologiques. Ce type de traitement utilise des micros organismes ayant la capacité de sécréter des enzymes capables de dégrader la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Ce sont généralement des champignons de pourriture blanche, brune et rouge

Tableau (7) : les méthodes de prétraitements utilisées [25]

| <u>Physique</u> | <u>Chimique</u> | <u>Biologique</u> |
|---|--|-------------------|
| Broyage à boules Broyage à marteau | <u>Alcalis</u> - Hydrolyse de sodium - Ammoniaque - Sulfite d'ammonium | Champignon |
| Pyrolyse Irradiation à haute énergie | <u>Acide</u> - Acide sulfurique - Acide chlorhydrique - Acide phosphorique | |
| | <u>Gaz</u> - Dioxyde de chlore - Dioxyde d'azote - Dioxyde de soufre | |
| | <u>Agent oxydant</u> - Peroxyde d'hydrogène - Ozone | |
| Vapeur | <u>Solvants de la cellulose</u> - Cadoxen - CMCS | |
| | <u>Solvants extractifs de la lignine</u> - Extraction ethanol-eau - Extraction benzene-ethanol - Extraction éthylène-glycol | |

IV-2/ Différent prétraitements :

IV-2-1/ Prétraitements Physiques:

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

1-1/Le broyage:

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

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

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. Par contre à des températures intermédiaires la décomposition a lieu lentement et peu de produits volatils sont formés.[38]

1-3/Irradiation a haute énergie:

L'accessibilité de la cellulose et du matériel ligno-cellulosique à l'hydrolyse augmente sous l'effet de l'irradiation a 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 [39] a montré que l'irradiation gamma est très efficace dans l'augmentation de la surface spécifique, due à une dépolymérisation intense, mais moins 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.

1-4/Prétraitement a 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 Iteck [2]. Le substrat est soumis à une pression élevée à chaud (225°C/25atm) puis brutalement décomprimé.

La cellulose obtenue suivant ce procédé est presque totalement hydrolysable. La lignine devient extractible par les solvants tandis que les hémicelluloses sont converties en oligosides solubles [1,2].

IV-2-2/ Prétraitement chimique:

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

En effet, les consommations des produits chimiques pour la réaction et pour la neutralisation du produit traité sont onéreuses et les polluants engendrés obligent à mettre en place d'importants moyens de traitement et de récupération des réactifs. Selon la nature chimique du réactif, les prétraitements chimiques sont classés en plusieurs catégories:

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 spécifique, la diminution du degré de polymérisation, la diminution de la cristallinité, la séparation des liaisons structurales entre lignine et carbohydrates, et la destruction de la structure de la lignine [27].

2-2/Prétraitements acides:

Ce type de prétraitement a surtout été proposé dans l'objectif d'une valorisation de la cellulose en ethanol. Il se base sur la différence de résistance à l'hydrolyse acide entre hémicellulose et cellulose. Il utilise généralement du H₂SO₄ à des concentrations de 1 à 3 %. Les températures et durées de traitement varient suivant les technologies utilisées.

À l'issue du traitement, l'effluent liquide renferme des sucres (essentiellement des sucres en C5) provenant de l'hydrolyse des hémicelluloses. Le résidu solide renferme la partie cellulosique et les lignines. Les sucres sont instables en milieu acide chaud et se dégradent en composés aldéhydriques de type furfural. Ces produits de dégradation inhibent les fermentations, le choix des conditions expérimentales est donc un compromis visant la vitesse d'hydrolyse des hémicelluloses la plus élevée pour une formation de produits toxiques compatibles avec une utilisation en fermentation des sucres produits [1].

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

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 le *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].

IV-2-3/ Prétraitements biologiques:

Ce type de prétraitement utilise des micro-organismes ayant la capacité de sécréter des préparations enzymatiques qui dégradent la cellulose, les hémicelluloses et la lignine.

Ce sont généralement des champignons de pourriture blanche, brune et rouge. Les champignons de pourriture blanche dégradent simultanément la cellulose les hémicelluloses et les lignines par leurs complexes cellulolytiques qui contiennent des endo-glucanases, des exo-glucanases et des B-glucosidases. Il s'agit principalement de Basidiomycetes (ex : *Coriolus versicolor*) mais aussi d'ascomycetes (ex: *Tichardema reesei*). Les champignons de pourriture brunes sont presque tous des basidiomycètes. Ils sont taxonomiquement proches des champignons de pourriture blanche.

Ils dégradent la cellulose et les hémicelluloses. Ces champignons produisent des endoglucanases, mais pas d'exo-glucanases, ceci ne présente pas d'obstacle à la dégradation de la cellulose cristalline qui s'effectue selon un mécanisme faisant appel au système oxydatif H_2O_2 / Fe^{2+} [2] [7].

Le prétraitement biologique provoque une augmentation spectaculaire de la dégradabilité de la cellulose mais il reste coûteux.

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

Chap

IV-2-3

pré

cha

les

exo-

Co

pau

des

sug

le

Chapitre V

Le couplage champ électrique / procédé Unitaire

11/10/97

Le développement de l'électricité comme nouvelle source d'énergie, l'aspect non polluant et les facilités d'automatisation qu'elle apporte ont amené les industriels et les chercheurs, à préconiser dans beaucoup de cas l'utilisation des procédés électro-biologiques. En effet, l'utilisation d'une énergie électrique permet de traiter pas mal de substances sans être obligé d'enrichir celle-ci par d'autres éléments chimiques.

Pour cela, nous nous sommes proposés de mettre en œuvre une alternative sans équivoque pour l'amélioration d'un procédé biologique, qui est basé sur la combinaison de l'hydrolyse enzymatique et un champ électrique.

Dans cette étude, il importe que le champ utilisé soit optimisé. L'application de celui-ci peut être inhibitrice ou fatale à l'enzyme.

Les réacteurs discontinus couplés à un champ électrique ont un fonctionnement simple et économique. C'est la raison pour laquelle, nous allons utiliser un tel dispositif pour déterminer grâce à des expériences à l'échelle laboratoire des conditions d'hydrolyse transposable au réacteur continu.

V-1/Etudes antérieures :

Nous avons consulté plusieurs bases bibliographiques, aucune source ne fait mention de l'application d'un champ électrique à l'hydrolyse d'une substance donnée, mais nous donnerons ci-après, quelques essais basés sur le couplage d'un champ électrique avec un autre procédé.

Plusieurs expériences en mode batch couplées à un champ électrique, ont été réalisées dans le but d'augmenter le rendement de certaines réactions ou d'améliorer certains procédés.

On cite quelques-unes de ces recherches :

- L.ADOUR [30] : à étudier l'amélioration de la capacité d'adsorption des fluorures sur alumine activée par application d'un champ électrique ; les résultats obtenus montrent que l'utilisation du potentiel électrique conjointement avec l'adsorption sur une colonne (acier inoxydable) d'alumine activée, se prête bien à l'amélioration de la capacité d'élimination des ions fluorures.
- VIS VANATUAN [31] : proposé l'étude du rôle de la fraction colloïdale et l'influence d'un champ électrique sur les phénomènes de colmatage en micro-filtration tangentielle ; l'application d'un champ électrique permet de réduire ou d'éliminer l'accumulation des colloïdes et des particules au voisinage de la membrane.
- Y.LEMOUESSEKH [33] : Amélioration du procédé d'ultrafiltration par Application d'un Champ Eléctrique : les résultats obtenus montrent que l'utilisation du potentiel électrique conjointement avec l'ultrafiltration, se prête bien à l'amélioration du procédé ; le phénomène de polarisation de concentration est optimisé en déplaçant les protéines par l'action d'un champ électrique.

- Prof.J-P.Zryd [34] : Influence des champ magnétiques sur le développement de la mousse *Physcomitrella patens* : par ce travail ils ont pu montré l'effet, au niveau biologique, des champs magnétiques de différentes fréquences sur le développement de la mousse *P.patens*.

V-2/développement théorique:

L'application d'un champ électrique créé par une tension continue provoque, un flux de migration des particules chargées (l'enzyme) de la suspension (substrat +enzyme).

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

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

E: champ électrique.

U_{em} : mobilité électrophorétique des particules.

La projection du champ électrique sur l'axe des Z est donnée par le théorème de Coulomb ; le champ électrique est constant entre les deux plaques :

$$E = U/d$$

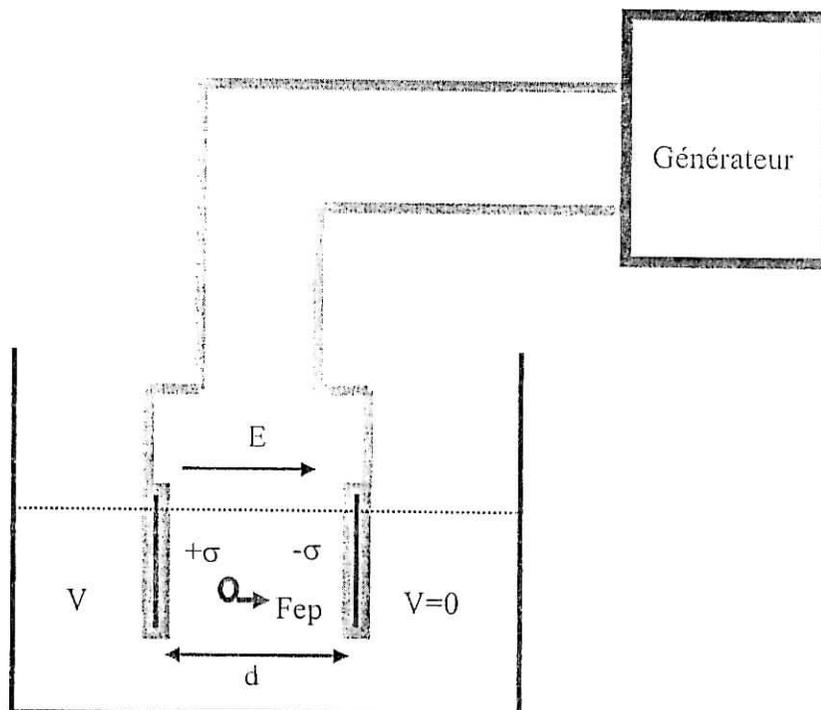


Schéma (7) : l'influence du champ électrique sur l'hydrolyse enzymatique.

E: champ électrique.

d : distance entre les deux plaques.

U: potentiel électrique.

O: Une particule chargée.

F_{ep} : force électrophorétique.

Dans notre cas le phénomène est très complexe on l'explique par :

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

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

L'application du champ électrique réduit la résistance au transfert des molécules enzymatiques de la phase liquide vers la surface de la cellulose ;

Le transfert se traduit par une création d'un flux de migration des enzymes ; ce lui ci va augmenter la mobilité de l'enzyme sachant que cette dernière possède une charge ;

Ce qui favorise l'accessibilité et la probabilité de contact entre le substrat et l'enzyme. d'autre part il favorise la formation du complexe enzyme-substrat par adsorption des molécules de l'enzyme sur les particules cellulosiques.

D'autre part on a que le champ va aidé au transfert des molécules du réactant-eau-au site actif du complexe ES.

De ces faits on peut dire que le champ pourra avoir un effet positif sur l'hydrolyse.

20/04/2019

1.00

1.00

1.00

1.00

1.00

1.00

1.00

1.00

1.00

PARTIE

EXPERIMENTALE

Chapitre I

Caractérisation et prétraitements des grignons d'olive

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

I-1/ Mode de préparation du substrat :

I-1-1/ Matériels et méthodes :

Le grignon d'olive a été prélevé au niveau de la région de Tademaït, durant la campagne oléicole 2000-2001. L'échantillon prélevé est constitué de pulpes et de fragments de noyaux ; il a été conditionné dans les sacs en plastique, puis traité comme suit :

- Séchage : l'échantillon a été séché à 70°C pour une meilleure conservation.
- Broyage : il a été ensuite finement broyé par un moulin de type RETCHE [2] ; puis par un broyeur à mâchoire « Fritsch pulverisette » type 02.102. N°4297. 220 volts.
- Tamisage : La poudre obtenue a été tamiser jusqu'à une granulométrie de 460µm.

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

a) Humidité :

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

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

b) Matière sèche :

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

$$M.S = 100 - H$$

c) Cendres Totales :

Les cendres totales sont définies comme étant le résidu obtenu après calcination à 550°C dans un four à moufle d'une prise d'essai de 5 g de substrat. Complémentairement au dosage des cendres brutes, la détermination spécifique des éléments minéraux (K^+ , Ca^{2+} , Na^+) s'avère dans certains cas nécessaire. Elle est réalisée par photométrie de flamme.

d) Matières Grasses :

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

e) Matières Azotées Totales :

La teneur en matières azotées totales (M.A.T) 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 (soude) et l'ammoniac libéré est dosé titrimétriquement 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.

$$\text{Taux de protéines} = N_T * 6.25$$

f) Cellulose brute :

La teneur en cellulose brute (C.B) est déterminée par la méthode de Weende (voir Annexe 2). Dans cette méthode, les matières cellulosiques correspondent au résidu organique insoluble obtenu après attaque acide (H_2SO_4 0.26 N) et alcaline (NaOH 0.31 N) du substrat.

g) Composés pariétaux :

La teneur en composés pariétaux (cellulose, hemicellulose et lignine) est déterminée par la méthode de Van Soest. Cette technique analytique (voir Annexe 3) permet d'isoler successivement trois résidus à savoir.

- N.D.F (Neutral detergent fiber) qui constitue l'essentiel de la paroi végétale.
- A.D.F (Acid detergent fiber) qui correspond à la ligno-cellulose.
- A.D.L (Acid detergent lignine) qui correspond à la lignine.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la matière sèche.

I-3/ Résultats et interprétations :

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

Tableau (8) : Caractérisation chimique des grignons d'olive en % de la matière sèche.

| | |
|---------------------------------|--------------|
| Matière sèche | 88,23 |
| Matières organiques | 92,11 |
| Matière grasse | 4,02 |
| Cendres totales | 4,55 |
| Matières azotées totales | 12,33 |
| Cellulose brute | 42,54 |
| Hemicelluloses | 19,43 |
| Lignine | 61,53 |

Les teneurs moyennes en éléments minéraux : potassium, calcium et sodium sont données dans le tableau (10.a) qui suit :

Tableau (9.a) : les teneurs éléments minéraux en % de M.S

| Elément | Teneur |
|-----------|--------|
| Potassium | 0,11 |
| Calcium | 0,39 |
| Sodium | 0,20 |

Sur la base de la composition chimique de Weende (voir Annexe 2), et comparativement aux autres aliments grossiers (paille, foin), les grignons d'olive ont une teneur en constituants pariétaux inférieure à celle de la paille et du même ordre de grandeur du celui du foin.

L'utilisation de la méthode de fractionnement de VAN SOEST (Annexe 3), met en relief la singularité de ce sous-produit, car malgré qu'il soit riche en cellule fibrillaire et une teneur en matières azotées totales favorables, ce résidu possède une valeur nutritionnelle et énergétique très faible.

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

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

I-4/ Les prétraitements des grignons d'Olive :

I-4-1/ Matériels et Méthodes :

- Prétraitement physique : Il consiste à broyer le substrat et le tamiser.
- Prétraitement chimique : Les conditions habituelles de ce prétraitement sont : une concentration de soude de 5g/l. concentration de grignons d'olive de 100g/l, température de traitement de 100C° et une durée de traitement de 1heure [54].

Les résultats de l'analyse chimique du grignon d'olive traité à la soude aux conditions opératoires optimales sont présentés dans le tableau (9) :

Tableau (9.b) : principales Caractéristiques du substrat expérimentale en % de M.S.

| | |
|--------------------------|-------|
| Matière sèche | 85,12 |
| Matières organiques | 96,11 |
| Matière grasse | 1,88 |
| Cendres totales | 10,45 |
| Matières azotées totales | 3,26 |
| Cellulose brute | 40,30 |
| Hemi cellulose | 7,23 |
| Lignine | 49,39 |

| Elément | Teneur |
|-----------|--------|
| Potassium | 0,19 |
| Sodium | 0,16 |

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

Le traitement à la soude fait diminuer les teneurs en hémicellulose et en lignine de 24.58% et de 52.12% respectivement. Les diminutions des teneurs en cellulose, en matières azotées totales et en matières grasses après traitement. Sont pratiquement faibles.

Ces résultats semblent être proches de ceux obtenus par AGUILERA J.F [56] et MOSS A.R. [57]. Par ailleurs. SUSUMU et col [58], en appliquant un traitement à la vapeur obtiennent de meilleurs résultats.

L'étude de la caractérisation chimique des grignons d'olive a montré que ce résidu est riche en carbohydrates, cible de l'attaque enzymatique, et pauvre en azote. La composition chimique du grignon d'olive après prétraitement à la soude nous a permis de constater. que l'alcali agit principalement sur l'hémicellulose et partiellement sur la lignine.

Chapitre II

Hydrolyse enzymatique couplée à un champ électrique

II-1/Introduction :

Le but de notre étude expérimentale est d'améliorer le rendement d'hydrolyse enzymatique en appliquant un champ électrique.

Notre étude expérimentale du couplage des deux procédés, électrochimique et biologique nous permet de suivre l'effet du champ électrique sur le rendement de l'hydrolyse enzymatique du grignon d'olive par une enzyme cellulosique en fonction du temps.

De ce fait, notre travail est basé sur les étapes suivantes ;

La 1^{ère} étape consiste à faire une hydrolyse enzymatique du grignon d'olive traité.

Au cours de la 2^{ème} étape on étudie l'influence du potentiel électrique sur l'hydrolyse enzymatique d'un substrat non traité.

Dans la 3^{ème} étape nous avons optimisé la valeur du potentiel en prenant l'intervalle ; [0.05, 0.2] En fixant les autres paramètres.

La dernière étape on compare les deux voies suivantes :

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

La seconde électro-biologique : consiste en une application d'un champ électrique à l'hydrolyse enzymatique du grignon d'olive .

II-2 / Matériels, Mode opératoire et Méthodes d'analyses :**II-2-1/Matériels :**

La figure (8) représente le dispositif expérimental en batch. Ce lui ci est composé de :

- Becher 150 ml.
- Bain marie thermostat avec agitation.
- Générateur de tension de type leybold-heraeus 5220 30.
- Deux électrodes en inox de :
Largeur $l= 1,8$ cm Longueur $L= 9,5$ Epaisseur $e= 0.08$ cm

Le mélange réactionnel est constitué de :

- L'enzyme cellulolytique : une préparation enzymatique en poudre, purifiée et fabriquée par la firme SIGMA a été utilisée, c'est une cellulase EC 3.2.1.4 d'origine fongique (Trichoderma reesei).
- Grignons d'olive traitée.
- Solution tampon d'acide acétique/ acétate de sodium 0.05 M et pH=5 : Les solutions A et B sont préparée comme suit :

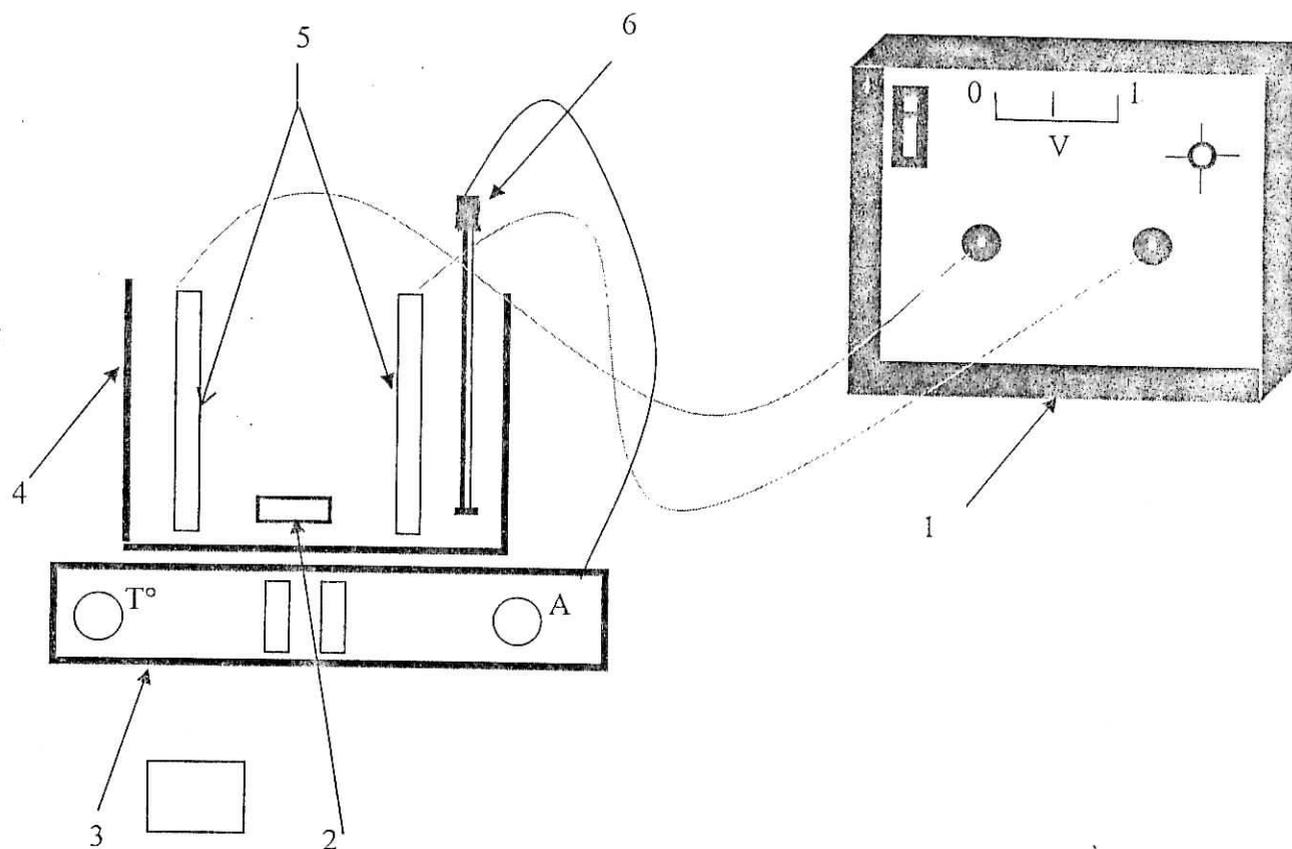


Figure (8) : le bioréacteur

- | | | |
|----------------|------------------------|------------------|
| 1 : générateur | 2 : barreau magnétique | 3 : agitateur |
| 4 : bêcher | 5 : deux électrodes | 6 : thermocouple |

A : solution acide acétique 0.5 M (28.87 ml de CH_3COOH + eau pure q.s.p 1 litre ;
 B : solution d'acétate de sodium 0.5 M (68 g de CH_3COONa ou 122g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + eau pure q.s.p 1 litre).

II-2-2/ Mode opératoire et Méthodes d'analyses :

Pour suivre l'évolution dans le temps de la production du glucose, nous procédons aux Étapes suivantes :

- Préparer la solution d'enzyme par incorporation de celle-ci dans de solution tampon à pH 5 ;
- Remplir le réacteur avec la solution d'enzyme préparée ;
- 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 échantillon de 1ml est prélevé du mélange réactionnel puis transvasé dans un tube contenant 1 goutte de solution d'acide H_2SO_4 concentré afin d'arrêter la réaction d'hydrolyse.
- prendre par la suite plusieurs prélèvements d'échantillons, à des intervalles de temps bien définis en minutes.
- Le glucose (les sucres totaux) produit est dosé par la méthode de DUBOIS et al (annexe 4).

II-3/Résultats et interprétations :

II-3-1/Résultats :

Dans les conditions opératoires cités, on a utilisé l'enzyme cellulase d'activité cellulolytique de 11,2 units/mg.

$$E/S=0,05988$$

$$E=2\text{g/l}$$

$$S=33,4\text{g/l}$$

$$\text{Activité cellulolytique} = 11,2 \text{ units/mg.}$$

$$T=50 \text{ }^\circ\text{c}$$

$$\text{pH}=5$$

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

Ces résultats sont portés sur la figure (7).

1) Cas :**TABLEAU (10) :** les résultats de l'hydrolyse enzymatique sans l'application du champ électrique (un substrat prétraité).

| Temps (h) | mg/l de sucres totaux | $\frac{\text{g de sucres totaux}}{\text{g de grignon}}$ | Rendement d'hydrolyse |
|-----------|-----------------------|---|-----------------------|
| 0.0 | 15,06 | 0,0005 | 0,11 |
| 0.5 | 261,77 | 0,0078 | 1,94 |
| 1.0 | 572,89 | 0,0172 | 4,25 |
| 1,5 | 741,00 | 0,0222 | 5,50 |
| 2,0 | 981,33 | 0,0294 | 7,29 |
| 3,0 | 1098,00 | 0,0329 | 8,16 |
| 4,0 | 1685,00 | 0,0504 | 12,52 |
| 5,0 | 2213,77 | 0,0663 | 16,44 |
| 6,0 | 3100,00 | 0,0928 | 23,03 |
| 7,0 | 3850,10 | 0,1153 | 28,60 |
| 8,0 | 4821,21 | 0,1443 | 35,82 |

2) Cas :**TABLEAU (11) :** les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec application du champ électrique $U=0.1V$ (un substrat prétraité).

| temps (h) | mg/l de sucres totaux | $\frac{\text{g de sucres totaux}}{\text{g de grignon}}$ | Rendement d'hydrolyse |
|-----------|-----------------------|---|-----------------------|
| 0,0 | 23,73 | 0,001 | 0,176 |
| 0,5 | 292,88 | 0,009 | 2,176 |
| 1,0 | 596,60 | 0,018 | 4,432 |
| 1,5 | 962,66 | 0,029 | 7,152 |
| 2,5 | 1390,22 | 0,042 | 10,328 |
| 3,5 | 1773,60 | 0,053 | 13,177 |
| 4,5 | 2867,21 | 0,086 | 21,301 |
| 5,5 | 3610,10 | 0,108 | 26,821 |
| 6,3 | 4500,30 | 0,135 | 33,434 |

3) Cas :**TABLEAU (12) :** les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec application du champ électrique $U=0.1V$ (substrat non prétraité).

| temps (h) | mg/l de sucres totaux | $\frac{\text{g de sucres totaux}}{\text{g de grignon}}$ | Rendement d'hydrolyse |
|-----------|-----------------------|---|-----------------------|
| 0 | 83,40 | 0,002 | 0,62 |
| 1 | 616,22 | 0,018 | 4,58 |
| 1,5 | 746,00 | 0,022 | 5,54 |
| 2,5 | 968,00 | 0,029 | 7,19 |
| 3,5 | 1300,10 | 0,039 | 9,66 |
| 4,5 | 1886,40 | 0,056 | 14,01 |
| 5,5 | 2280,51 | 0,068 | 16,94 |
| 6,5 | 2445,12 | 0,073 | 18,16 |
| 7,5 | 3101,51 | 0,093 | 23,04 |

Condition opératoire :

E/S=0.05988

E=2g/l

S=33.4g/l

Activité cellulolytique =11,2 units/mg

T=50 °c

pH=5

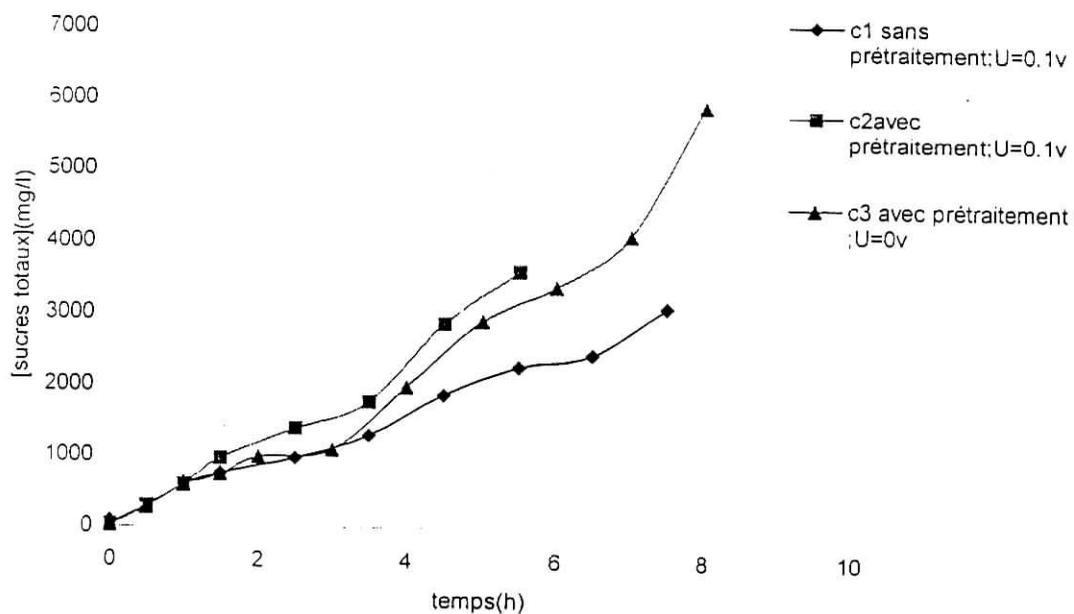
Cinétique D' hydrolyse Du Grignon D'olive

Figure (9) : L'influence du champ électrique sur la cinétique d'hydrolyse du grignon d'olive par 1ère enzyme

Condition opératoire :

$E/S=0.05988$

$E=2g/l$

$S=33.4g/l$

Activité cellulolytique = 11,2 units/mg

$T=50\text{ }^{\circ}C$

$pH=5$

rendement de l'hydrolyse

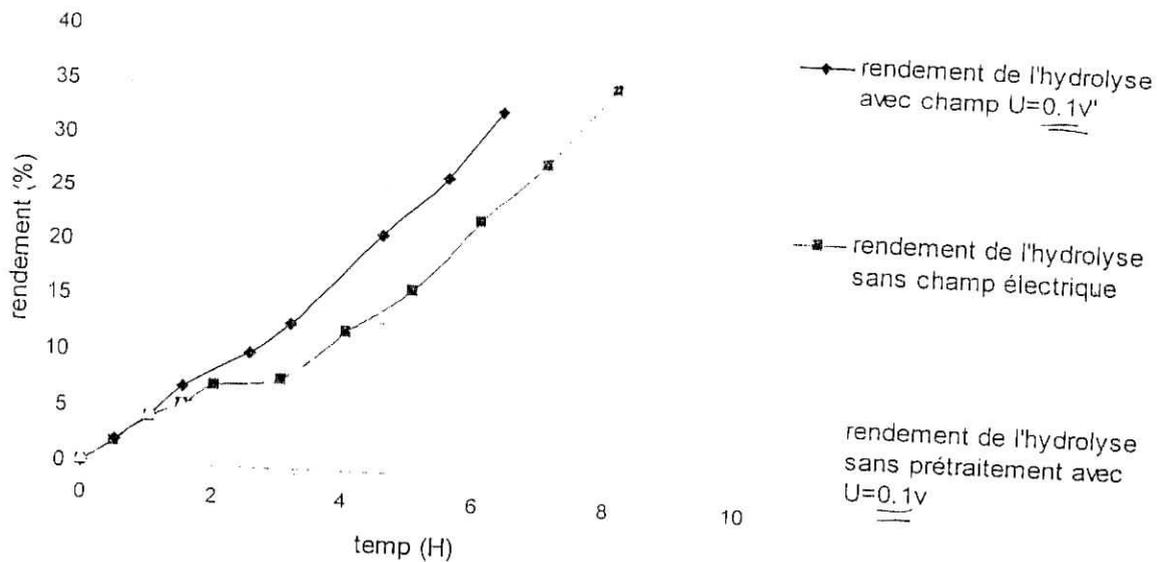


Figure (10) : L'influence du champ électrique sur le rendement de l'hydrolyse du grignon d'olive par la lère enzyme

$E/S=0.05988$
 $E=2g/l$
 $S=33.4g/l$
 Activité cellulolytique = 11,2 units/mg
 $T=50\text{ }^{\circ}C$
 $pH=5$

A partir de ces figures nous constatons que :

La figure n°(9) montre l'évolution de la quantité des sucres totaux produits lors d'une saccharification d'un substrat (grignon d'olive) prétraité en fonction du temps pour différentes valeurs de potentiel appliqué.

D'après l'allure de cette courbe, nous constatons qu'il ya une certaine concentration de produits (sucre totaux) à $t=0$ dès l'introduction du substrat dans le Bêcher et ce quelque soit la valeur du potentiel appliqué.

Cela est peut être due au prétraitement physique (broyage) qui libéré des sucres en cassant les liaisons qu'il ya entre eux.

Ces sucres sont solubilisés directement en les introduisant dans la solution.

On peut voir que l'application du champ à un effet positif sur la saccharification ; cela se traduit par un rendement obtenu assez élevé (voir la figure n° (9)) pour un $U=0.1V$ comparativement à celui obtenu à $U=0v$.

Dans notre cas, on a suppose que l'effet positif est dû à la réduction de la résistance au transfert des molécules enzymatiques de la phase liquide vers la surface de la cellulose et par l'augmentation de l'accessibilité et la probabilité de contact entre le substrat et l'enzyme ; qui favorise la formation du complexe enzyme-substrat par adsorption des molécules de l'enzyme sur les particules cellulosiques.

D'après la figure n°(10) ; on observe aussi que l'hydrolyse enzymatique du grignon brut prétraité à la soude caustique couplé a un champ électrique aboutir a un meilleur rendement de saccharification par rapport a un substant non traité dans les même conditions opératoires.

Pour cela on peut conclure que le champ électrique ne compense pas le prétraitement dans notre cas.

II-3-2/Résultats :

Dans nos conditions opératoires on a utilisé l'enzyme cellulase d'activité cellulolytique égale à 8.6 units/mg.

$E/S=0,05988$

$E=2g/l$

$S=33,4g/l$

Activité cellulolytique =8,6 units/mg.

$T=50^{\circ}C$

$pH=8$

A partir des résultats rapportés sur les tableaux (14-19), nous traçons le graphe donnant l'évolution de la concentration des sucres en fonction du temps.

Ces résultats sont portés sur la figure (10).

1) Cas :

TABLEAU (13) : les résultats de l'hydrolyse enzymatique sans application champ électrique pour la 2ème enzyme

| temps (h) | mg de sucres totaux | g de sucres totaux | Rendement d'hydrolyse |
|-----------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| | l | g de grignon | |
| 0 | 12,95 | 0,0004 | 0,09 |
| 0.5 | 72,00 | 0,0022 | 0,53 |
| 1 | 106,40 | 0,0032 | 0,79 |
| 1.5 | 167,64 | 0,0050 | 1,25 |
| 2.5 | 201,77 | 0,0060 | 1,49 |
| 3.5 | 231,00 | 0,0069 | 1,71 |
| 4.5 | 232,44 | 0,0070 | 1,72 |
| 5.5 | 265,55 | 0,0080 | 1,97 |
| 6.5 | 418,66 | 0,0125 | 3,11 |
| 7.5 | 414,55 | 0,0124 | 3,07 |
| 8.5 | 553,78 | 0,0166 | 4,11 |
| 9.5 | 678,00 | 0,0203 | 5,04 |

2) Cas :

TABLEAU (14) : les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec application du champ électrique $U=0.09$ V pour la 2ème enzyme

| temps (h) | mg de sucres totaux | g de sucres totaux | Rendement d'hydrolyse |
|-----------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| | l | g de grignon | |
| 0 | 28,15 | 0,0008 | 0,21 |
| 0,5 | 32,22 | 0,0010 | 0,24 |
| 1 | 36,77 | 0,0011 | 0,27 |
| 1,5 | 40,33 | 0,0012 | 0,29 |
| 2 | 123,73 | 0,0037 | 0,92 |
| 3 | 156,87 | 0,0047 | 1,17 |
| 4 | 171,00 | 0,0051 | 1,27 |
| 5 | 450,22 | 0,0135 | 3,34 |
| 6 | 615,55 | 0,0184 | 4,57 |
| 7 | 732,00 | 0,0219 | 5,44 |
| 8 | 1538,44 | 0,0461 | 11,42 |
| 9 | 2016,00 | 0,0604 | 14,97 |

3) Cas :TABLEAU (15) : les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec application du champ électrique $U=0.2$ V pour la 2eme enzyme

| temps (h) | mg de sucres totaux | g de sucres totaux | Rendement d'hydrolyse |
|-----------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| | l | g de grignon | |
| 0 | 43,29 | 0,0013 | 0,32 |
| 0.5 | 69,10 | 0,0021 | 0,51 |
| 1 | 102,67 | 0,0031 | 0,76 |
| 1.5 | 122,67 | 0,0037 | 0,91 |
| 2 | 212,78 | 0,0064 | 1,58 |
| 3 | 268,67 | 0,0080 | 2,00 |
| 4 | 414,56 | 0,0124 | 3,08 |
| 5 | 488,67 | 0,0146 | 3,63 |
| 6 | 514,56 | 0,0154 | 3,82 |
| 7 | 604,88 | 0,0181 | 4,49 |
| 8 | 784,41 | 0,0235 | 5,83 |
| 9 | 821,55 | 0,0246 | 6,10 |
| 10 | 1020,11 | 0,0305 | 7,58 |
| 11 | 1980,22 | 0,0593 | 14,71 |

4) Cas :TABLEAU (16) : les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec application du champ électrique $U=0.15$ V pour la 2eme enzyme

| temps (h) | mg de sucres totaux | g de sucres totaux | Rendement d'hydrolyse |
|-----------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| | l | g de grignon | |
| 0 | 14,81 | 0,00044 | 0,11 |
| 0.5 | 42,00 | 0,00126 | 0,31 |
| 1 | 67,07 | 0,00201 | 0,50 |
| 1,5 | 118,76 | 0,00356 | 0,88 |
| 2 | 184,00 | 0,00551 | 1,37 |
| 3 | 251,00 | 0,00751 | 1,86 |
| 4 | 339,11 | 0,01015 | 2,52 |
| 5 | 398,89 | 0,01194 | 2,96 |
| 6 | 475,33 | 0,01423 | 3,53 |
| 7 | 554,56 | 0,01660 | 4,12 |
| 8 | 682,67 | 0,02044 | 5,07 |
| 9 | 1098,00 | 0,03287 | 8,16 |
| 9,35 | 1414,44 | 0,04235 | 10,51 |

5) Cas :TABLEAU (17) : les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec application du champ électrique $U=0.05$ V pour la 2eme enzyme

| temps (h) | <u>mg de sucres totaux</u> | <u>g de sucres totaux</u> | Rendement d'hydrolyse |
|-----------|----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| | l | g de grignon | |
| 0 | 35,62 | 0,00107 | 0,265 |
| 0,5 | 254,78 | 0,00763 | 1,893 |
| 1 | 359,07 | 0,01075 | 2,668 |
| 1,5 | 518,76 | 0,01553 | 3,854 |
| 2 | 624,00 | 0,01868 | 4,636 |
| 3 | 881,00 | 0,02638 | 6,545 |
| 4 | 1176,89 | 0,03524 | 8,743 |
| 5 | 1415,56 | 0,04238 | 10,517 |
| 6 | 1848,67 | 0,05535 | 13,734 |
| 7 | 2320,11 | 0,06946 | 17,237 |
| 8 | 2967,11 | 0,08884 | 22,044 |
| 8.8 | 3453,00 | 0,10338 | 25,653 |

6) Cas :TABLEAU (18) : Les résultats de l'hydrolyse enzymatique avec application du champ électrique $U=0.01$ V pour la 2eme enzyme

| temps (h) | <u>mg de sucres totaux</u> | <u>g de sucres totaux</u> | Rendement d'hydrolyse |
|-----------|----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| | l | g de grignon | |
| 0 | 8,07 | 0,00024 | 0,06 |
| 0,5 | 206,22 | 0,00617 | 1,51 |
| 1 | 260,98 | 0,00781 | 1,93 |
| 1,5 | 306,22 | 0,00917 | 2,34 |
| 2,5 | 451,00 | 0,01350 | 3,44 |
| 3,5 | 696,89 | 0,02086 | 5,25 |
| 4,5 | 790,56 | 0,02367 | 5,83 |
| 5,5 | 1025,33 | 0,03070 | 7,14 |
| 6,33 | 1382,89 | 0,04140 | 10,33 |
| 7,5 | 1704,89 | 0,05104 | 12,66 |
| 8,5 | 2378,00 | 0,07120 | 17,67 |
| 9,5 | 2475,56 | 0,07412 | 18,39 |

Condition opératoire :

E/S=0,05988

E=2g/l

S=33,4g/l

Activité cellulolytique =8,6 unités/mg

T=50 °C

pH=5

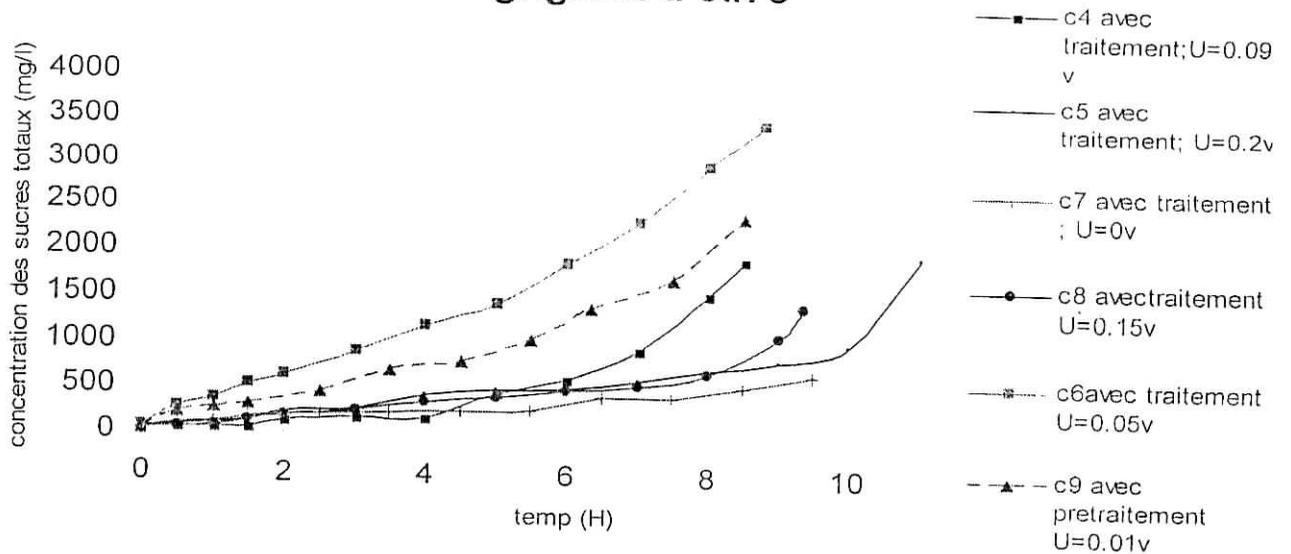
la cinétique de l'hydrolyse enzymatique du grignon d'olive

Figure (11) : L'influence du champ électrique sur la cinétique d'hydrolyse du grignon d'olive par 2ème enzyme

Condition opératoire :

E/S=0,05988

E=2g/l

S=33,4g/l

Activité cellulolytique =8,6 units/mg

T=50 °c

pH=5

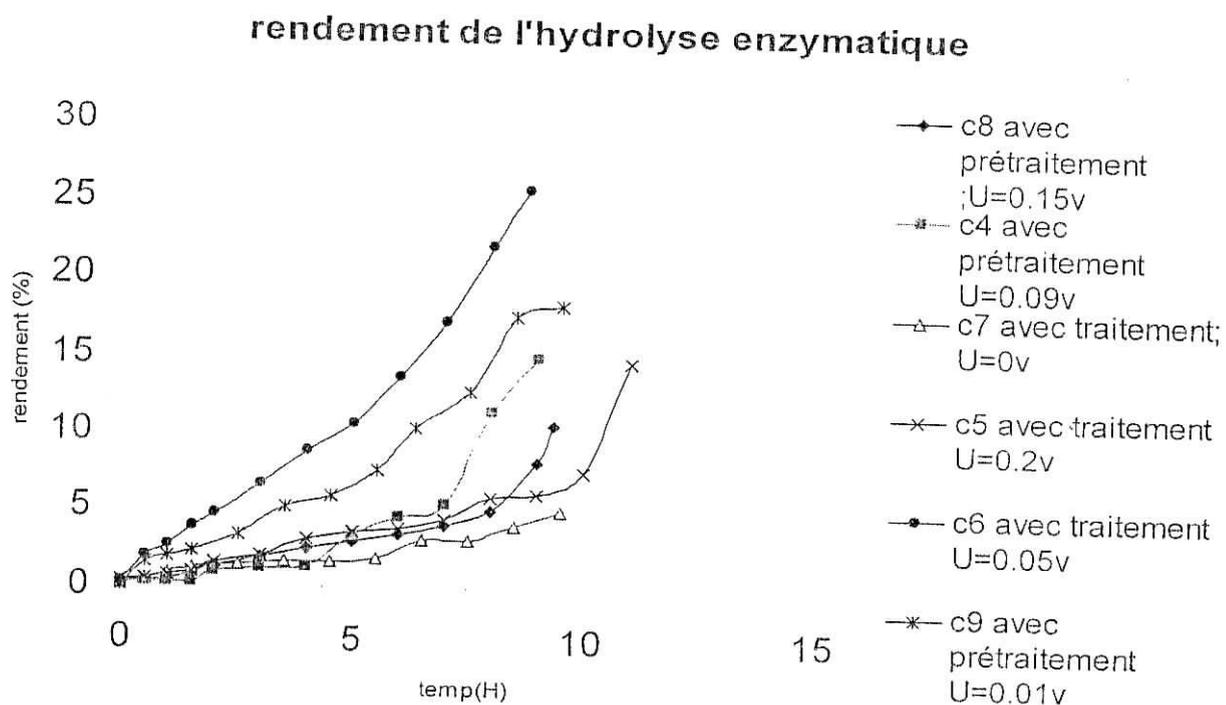


Figure (12) : L'influence du champ électrique sur le rendement de l'hydrolyse du grignon d'olive par la 2ème enzyme

A partir de ces figures nous constatons que :

Dans notre étude on a choisi les valeurs de l'intervalle suivant [0.01v ; 0.2v] ce qui donne un bon rendement d'hydrolyse dans le cadre économique.

D'après la figure (9) on observe que pour $U = 0.05$ v le rendement est maximum ; pendant les premières minutes la vitesse d'hydrolyse est élevée, puis elle décroît lentement au cours de la réaction.

Ce ralentissement de l'hydrolyse est dû à plusieurs facteurs ;

- ❖ L'hétérogénéité de substance : les parties les plus facilement dégradables sont hydrolysées les premières.
- ❖ L'inhibition par les produits de la réaction.
- ❖ L'inactivation thermique et l'absorption irréversible d'une partie des enzymes sur le substance

Pour nos résultats on remarque que le champ pour $U = 0.05$ v donne des meilleurs résultats car peut être que pour un potentiel très fort le courant dégrade notre enzyme et la colmate sur la surface des électrodes et dans le cas pour un potentiel très faible l'influence du champ électrique est négligeable.

Fig 9

Fig 10

Fig 11

Fig 12

Fig 13

Conclusion générale

Conclusion Générale

L'objectif de notre étude est de voir l'influence du champ électrique sur l'hydrolyse enzymatique du grignon d'olive.

Pour ce faire, nous avons étudié les caractéristiques chimiques du grignon .ce dernier est caractérisé par une fort teneur en cellulose brute qui constitue l'objectif essentiel de l'hydrolyse, ainsi qu'en lignine qu'elle constitue un obstacle pour ce procédé.

L'hydrolyse enzymatique du grignon brut prétraité à la soude caustique abouti à un meilleur rendement de saccharification dans les conditions suivantes :

$E = 2 \text{ g/l}$

$S = 33,4 \text{ g/l}$

$U = 0,005 \text{ V}$

Sur le plan générale, l'hydrolyse enzymatique couplée au champ électrique donne des résultats en cou rageants.

Ce pendant le mécanisme principal de la saccharification semble être une hydrolyse de divers type de liaisons entre les molécules de glucose qui constitue l'unité principale de la cellulose.

Par contre le mécanisme lié en appliquant un champ électrique est obscur.

Pour voir mieux l'influence de l'application du champ sur la réaction de saccharification, il est intéressant d'inverser les pôles dans des intervalles de temps bien déterminé.

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, l'application du champ électrique).

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 connue à ce jour.
- ❖ le coût élevé des prétraitements.
- ❖ le coût d'énergie nécessaire pour l'application du champ électrique.

Cependant la valorisation du grignon d'olive en sucres fermentescibles ne pourras s'effectuer dans le cadre d'un schéma générale, 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.

Bibliographie

- [1]. R.Scirban, Biotechnologie, Ed Tech et Doc. Lavoisier. paris 1993.
- [2]. Flandory L. (1995), « L'olivier : moins de kilos. plus de Watt », Biofutur, 26-28 Décembre.
- [3]. C.O.I (1989), « Documentation. ED Française », N°25. Octobre.
- [4]. Talantikit M.et Ait Amar H. (1984), « Composition acide des huiles d'olive des trois cultivars d'Algérie ». Olivea 5^{ème} année. N°23.
- [5]. Données du ministère de l'équipement. 1994/1995.
- [6]. A.Mourache et C.L.Costes. « Hydrolases et dépolymérase. enzymes d'intérêts industriels », édition Gauthier-villars . Bordas 1985.
- [7]. M.S.Benhabyles. « Hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonneries », thèse de magister, E.N.P 1992.
- [8]. A.Bakalem, « Caractérisation et traitement d'un rejet d'huile : le grignon d'olive », projet de fin d'études, E.N.P 1995.
- [9]. C.Claudigie et G.DUPONT, « Principes des méthodes d'analyses ». édition Doin. 1995.
- [10]. U.Pallota et P.Capena, « les sous produits de l'industrie oléicole et leur utilisation », séminaire oléicole international FAO. 1967.
- [11]. L.Belkacem, « Valorisation et traitement des rejets des huileries en Algérie », séminaire. Alger 1992.
- [12]. B.Monties, « Les polymères végétaux. édition Gauthier-Villards », Bordas 1980.
- [13]. S.Ouamane, « Hydrolyse enzymatique du cruor par la papaïne », projet de fin d'études E.N.P, 1994.
- [14]. P.Ducroo, « Utilisation industrielle des enzymes », Ind. Aliment. Agric, 1982.
- [15]. C.Costes, « Eléments de biochimie structurale », édition Dunod, université de Paris 1978.
- [16]. D.Mameri, Cours de biochimie, E.N.P Dpt. G.Env, 1993.

- [17]. N.Mameri, F.Hamdache, N.Abdi, D.Belhocine, H.Grib, H.Lounici. « Enzymatic saccharification of olive mill solid residue in a membrane reactor », ELSEVIER journal of membrane science 178(2000) 121-130.
- [18]. C.Vidaud, S.Roussos, M. Raimbault, F.Deschamps. « Effet de divers prétraitements sur l'accessibilité de la cellulose de la paille de blé aux cellulases de trichodema harzianum », cah.O .R.S.T.O.M :sér.Biol. N° 45.1982.
- [19]. Pallot U. et Capella P., « les sous produits de l'olivier », Nouvel olivier, 1988, 123-128.
- [20]. Abdouli A., « valorisation alimentaire des grignons d'olive dans l'alimentation des ruminants », projet de fin d'études I.N.A. 1988.
- [21]. Pourquie J. et Vandecastelle J., « conversion des composés lignocellulosiques par hydrolyse enzymatique », dans Biotechnologie. SCRIBAN. Ed Tech et doc. Lavoisier, paris 1993.
- [22]. Chapeville F., « Biochimie », Ed Herman, Paris 1977.
- [23]. William R.W et Henry E. (1987). Hemicellulose digestibility by steers fed cured hay and drum-dehydrated Alfafa Coastal bermuda grass. J. Agric. Food. Chem.35.698-704.
- [24]. Kent K.T. Hyguchit et Chang H.M. (1981). Linignin biodegradation : Microbiology chemidry and potential application. vomume 1.2 eme Ed Boca Raton,Floride.
- [25]. Vinod P.P (1884).Effectof cristallinity and degree of polymerisation of cellulose enzymatic saccharifications of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis.Biotech.and bioeng,25.157.172.
- [26]. Sun B.L. et Kid J.A.(1983). Strctural properties of cellulase and cellulase mechanisms. Biotech and bioeng,25,33-35.
- [27]. Gharpuray M.Young Huyun L. et Fan L.T (1983).Strutural modifications of lignocellulosic by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. Biotechand bioeng,25,157-172.
- [28]. Morrison I.M.(1988).Influence of chemical and biological pretreatments on the degradation of lignocellulose material by biological systems.Journal of science food agriculture,42,295-304.
- [29]. Ducroo P. (1982). Utilisation industrielle des enzymes .IND Aliment.Agric, 39,401-416.
- [30]. L.Adour. «L'amélioration de la capacité d'adsorption des fluorures sur alumine activée par application d'un champ électrique», Magister, E.N.P 1993.

- [31]. Vis Vanathan. «L'étude du rôle de la fraction colloïdale et influence d'un champ électrique sur les phénomènes de colmatage en microfiltration tangentielle» projet de fin d'études. I.N.P Toulouse, 1988.
- [33]. Mr Y.Lemouessekh. «Amélioration du procédé d'ultrafiltration par Application d'un Champ Électrique » projet de fin d'études. E.N.P 1989.
- [34]. Prof.J-P.Zryd. «Influence des champ magnétiques sur le développement de la mousse *Physcomitrella patens*»: projet de fin d'études. université de Lausanne-faculté des sciences 1998.
- [35]. F.Chikh, « Hydrolyse enzymatique d'un rejet d'huilerie 'grignon d'olive' », projet de fin d'études E.N.P, 1995/1996.
- [36]. F.Halat, « Hydrolyse enzymatique des grignons d'olive », thèse de magister E.N.P, 1999.
- [37]. A.Nefzaoui. « Valorisation des résidus ligno-cellulosiques dans l'alimentation des ruminants par les traitements aux alcalis. Application au grignon d'olives ». thèse d'état, université catholique de Louvain-La-Neuve.Belgique. 1985.
- [38]. Fan L.T et Young Huyun L., « The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis », *advances in biochemical engineering Biotechnology*, 42, 156-182.
- [39]. Young Huyun L.T.Fan, « Kinetic studies of enzymatic Hydrolysis of insoluble cellulase: analysis of the initial Rates ». *Biotech and bioeng.* 24.2383-2406.

[31]

[33]

[34]

[35]

[36]

ANNEXE

ANNEXE 1

Méthode de KJELDAHL :

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

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

b- Distillation :

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

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

Ouvrir le robinet puis rincer le réservoir.

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

Ouvrir le robinet de vapeur et distiller pendant 5mn ;

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

c- Le titrage

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

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

Avec : Va : Volume d'acide ajouté (ml)

me : Masse de la prise d'essai

d : Densité de l'échantillon à doser

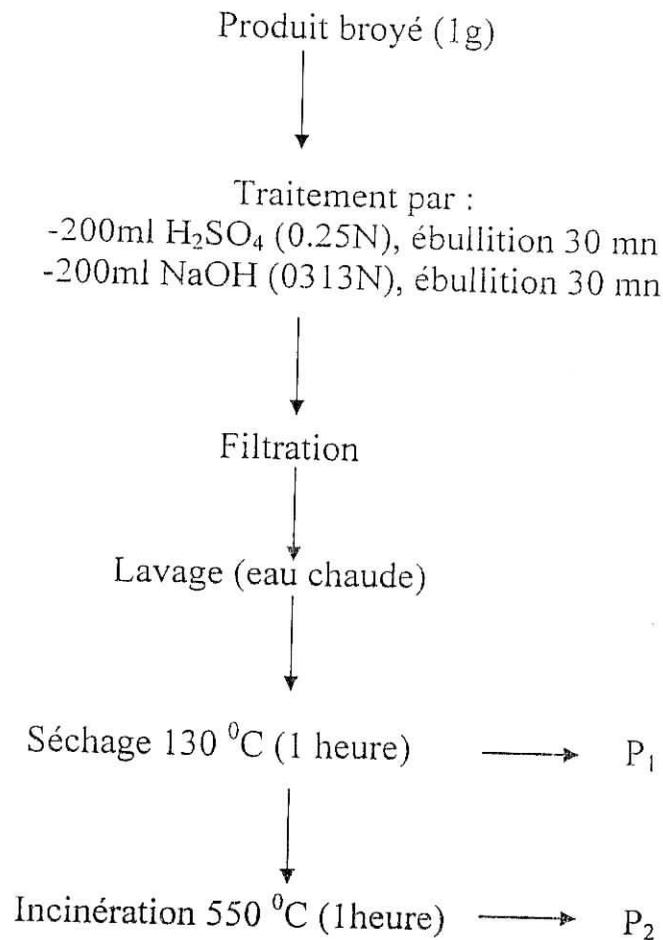
$$\% \text{ protéines} = \% \text{ d'azote total} . 6,25$$

ANNEXE 2

Détermination de la cellulase : Méthode de WEENDE (1809) :

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

Le schéma suivant résume le processus opératoire utilisé :



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

ANNEXE 3

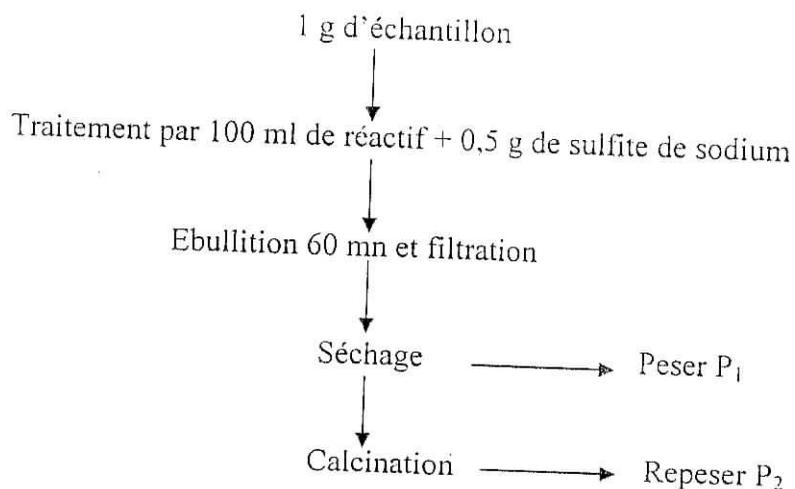
Méthodes de fractionnement de Van-Soest :

Cette technique permet d'isoler successivement trois résidus :

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

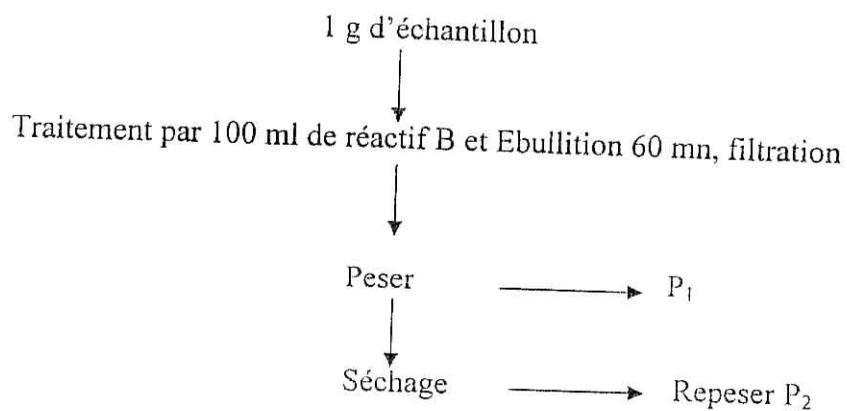
Réactif A : solution de :
Lauryl sulfate de sodium
EDTA sel disodique
Phosphate disodique
Ethoxyéthanol en milieu aqueux

Principe :



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

Réactif B : solution de bromure ethyltriméthylamonium en milieu sulfurique.



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

ANNEXE 4

Méthode de DUBOIS :

- Dissoudre 100 mg de glucose dans 100 ml d'eau distillée.
- Prendre de la solution précédente 4 ml et compléter à 50 ml
- Préparer une série de tubes à essai (09) dans lesquels est versé 0.1 ml, 0.2 ml, ... 0.9 ml de la solution fille (4/50).
- Comparer les volumes des tubes à 1 ml avec de l'eau distillée.
- Ajouter 1 ml de phénol à 5% à tous les tubes à essai, et agiter énergétiquement.
- Placer les tubes dans un bain d'eau glacée et verser 5 ml de H_2SO_4 dans tous les tubes, et agiter énergétiquement.
- Laisser refroidir à la température ambiante / 30 mn, et à l'obscurité.
- Lire la densité optique à 490 nm.

| Tubes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Solution (ml) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 |
| Eau distillée (ml) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 |
| Phenol (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Acide sulfurique (ml) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Concentration (mg/l) | 8 | 16 | 24 | 32 | 40 | 48 | 56 | 64 | 72 |

ANNEXE 4

Courbe D'étalonnage :

| C (mg/l) | DO | n°de tube |
|----------|-------|-----------|
| 0 | 0,062 | 1 |
| 8 | 0,206 | 2 |
| 16 | 0,273 | 3 |
| 24 | 0,304 | 4 |
| 32 | 0,422 | 5 |
| 40 | 0,491 | 6 |
| 48 | 0,513 | 7 |
| 56 | 0,597 | 8 |
| 64 | 0,662 | 9 |
| 72 | 0,774 | 10 |

