



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique



**Université Amar Thelidji- Laghouat**

**FACULTE : TECHNOLOGIE**

**DEPARTEMENT : GÉNIE DES PROCÉDÉS**

## **MEMOIRE DE MASTER**

**Présenté par :**

**GHERBI Hossam Eddine**

**MOULAI Hamza**

**DOMAINE : Sciences et Technologies**

**FILIERE : Industrie pétrochimique**

**OPTION : Génie pétrochimique**

### **Thème**

**Traitement des polluants phénoliques pétroliers  
par un biocatalyseur**

#### **Jury de soutenance :**

<b>Nom et Prénom</b>	<b>Grade</b>	<b>Qualité</b>
BOUTASSOUNA Nassima	MAA	Présidente
BELHADJ Souraya	MCB	Examinatrice
BENDAIGUANE Soumia	MAA	Rapporteuse

**Promotion : 2024/2025**

# Dédicaces

**Louange à Allah, gratitude et reconnaissance pour le début et la fin.**

**Le voyage n'a pas été court, et il ne devait pas l'être. Le rêve n'était pas proche, ni le chemin parsemé de facilités. Mais je l'ai fait, je l'ai atteint avec amour.**

**J'offre le fruit de ma réussite et de mon diplôme à celui dont je porte fièrement le nom, l'homme le plus important de ma vie, celui qui a écarté les épines de mon chemin pour me tracer la voie du savoir.**

**Puisse ta vie être longue, ô seigneur des hommes, et puisse-tu être pour moi toute une vie, mon cher père.**

**À mon paradis terrestre, à mon pont vers le paradis céleste, à celle dont les prières ont été le secret de ma réussite, dont la tendresse a apaisé mes blessures...**

**À celle qui a enduré chaque instant de douleur que j'ai vécu, qui m'a soutenue dans mes moments de faiblesse et de découragement, ma tendre mère.**

**À mon pilier solide qui ne fléchit jamais, à ceux que Dieu m'a accordés comme soutien et refuge, mes frères et sœurs.**

**Aux compagnons de route et aux partenaires de rêve, à ceux qui ont toujours été là quand ma vie trébuchait.**

**À ceux qui m'ont accompagnée dès les premiers pas jusqu'aux derniers.**

**À ceux qui, dans les années les plus dures, ont été une pluie bienfaisante.**

**À chaque personne de passage dans ma vie qui a laissé une belle empreinte...**

**Louange à Allah qui, par Sa grâce, nous a comblés de bien, d'espoir, de joie et de bonheur.**

**MOULAI Hamza**

# Dédicaces

**À mes amis proches, compagnons de route dans les moments de joie comme dans les défis, merci pour votre présence réconfortante et vos précieux conseils qui ont enrichi ce parcours.**

**À tous ceux qui, par une simple parole ou un geste de soutien, ont contribué à la réalisation de ce mémoire, même sans le savoir. Votre bienveillance a été un moteur invisible mais essentiel.**

**À mon pays, l'Algérie, qui m'a offert l'opportunité d'apprendre et de grandir, et dont je porte les espoirs et les aspirations à travers ce travail.**

**Enfin, à toute personne en quête de savoir, puisse ce modeste effort inspirer d'autres à persévérer, car le savoir est un héritage qui se partage et se multiplie.**

**"Qu'Allah fasse de ce travail une œuvre utile, et qu'Il guide nos pas vers ce qui Lui plaît."**

**GHERBI Houssam Eddine**

# Remerciements

**Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux.**

**Que la paix et les bénédictions soient sur le plus noble des prophètes et des messagers, notre maître et bien-aimé Mohammed — que la paix soit sur lui.**

**Avant tout, nous remercions Allah, exalté soit-Il, pour toutes les bénédictions visibles et invisibles. Nous Le louons pour le don de l'islam et du savoir, et nous Lui demandons la réussite et le succès dans l'accomplissement de ce travail.**

**Nous exprimons notre sincère gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.**

**À Mme Boutassouna Nassima, présidente du jury, pour l'honneur de sa présence et ses précieuses orientations.**

**À Mme Belhadj Sourya, examinatrice, pour le temps accordé à l'évaluation de ce travail et ses conseils avisés.**

**À Mme Bendahguane Soumia, notre encadreuse, pour son accompagnement bienveillant, sa patience et ses orientations décisives tout au long de ce parcours.**

**Nous témoignons également notre reconnaissance à nos enseignants qui nous ont guidés durant ces années d'études, offrant leur savoir, leur soutien et leurs efforts inestimables, après l'aide et la volonté d'Allah.**

**Enfin, nos remerciements les plus profonds vont à nos chers parents, frères, sœurs et à toute notre famille, pour leurs prières, leur amour et leurs encouragements sans faille. Que ce travail soit une fierté pour eux et une source de *baraka*.**

## Liste des Figures

<b>Figure I.1:</b> spectroscopie UV-Visible.....	13
<b>Figure II.1:</b> Gamme étalon.....	21
<b>Figure II.2:</b> Courbe d'étalonnage de l'albumine.....	21
<b>Figure II.3:</b> Influence du PH sur l'oxydation du diphénol.....	24
<b>Figure II.4:</b> Spectre d'absorption du diphénol.....	24
<b>Figure II.5:</b> Cinétique d'oxydation du diphénol.....	25
<b>Figure II.6:</b> Influence du PH sur l'oxydation du 1-amino-2-naphtol-4-acide sulfonique.	26
<b>Figure II.7:</b> Spectre d'absorption de 1-amino-2-naphtol-4-acide sulfonique.....	26
<b>Figure II.8:</b> Cinétique d'oxydation du 1-Amino-2-Naphtol-4-Acide sulfonique.....	27
<b>Figure II.9:</b> Influence du PH sur l'oxydation du phénol .....	28
<b>Figure II.10:</b> Spectre d'absorption de phénol.....	28
<b>Figure II.11:</b> Cinétique d'oxydation du phénol.....	29
<b>Figure II.12:</b> Influence du PH sur l'oxydation du diphénol méthyle hydroquinone .....	30
<b>Figure II.13:</b> Spectre d'absorption du méthyle hydroquinone.....	30
<b>Figure II.14:</b> Cinétique d'oxydation du méthyle hydroquinone.....	31
<b>Figure II.15:</b> Influence du PH sur l'oxydation du para-crésol .....	32
<b>Figure II.16:</b> Spectre d'absorption du para-crésol.....	32
<b>Figure II.17:</b> Cinétique d'oxydation du para-crésol.....	33
<b>Figure II.18:</b> Reçus de caisse.....	34
<b>Figure II.19:</b> Influence du PH sur l'oxydation du bisphénol .....	35

## Liste des Tableaux

<b>Tableau I.1</b> : toxicité des composés phénoliques.....	<b>12</b>
<b>Tableau II.1</b> : Préparation des étalons .....	<b>20</b>
<b>Tableau II.2</b> : activité enzymatique.....	<b>36</b>

# Sommaire

<b>Introduction Général</b> .....	2
<b>I.1 Historique</b> .....	4
<b>I.1.1 Évolutions Clés</b> .....	4
<b>I.2 Avantages des Biocatalyseurs</b> .....	5
<b>I.3 Biocatalyseur</b> .....	4
<b>I.4 Polyphénol oxydase (PPO)</b> .....	5
<b>I.4.1 Réaction catalysée</b> .....	5
<b>I.4.2 Importance</b> .....	5
<b>I.4.3 Inhibition de la PPO en agroalimentaire</b> .....	6
<b>I.4.4 Applications industrielles et biotechnologiques</b> .....	6
<b>I.5 Extraction de la polyphénol oxydase (PPO) à partir d'une source végétale</b> .....	7
<b>I.5.1 Méthode de dosage de Lowry</b> .....	7
<b>I.6 Efficacité enzymatique</b> .....	8
<b>I.7 Cinétique enzymatique</b> .....	8
<b>I.8 Activité enzymatique</b> .....	8
<b>I.8.1 Vérification de l'activité enzymatique</b> .....	9
<b>I.9 Polluants phénoliques</b> .....	9
<b>I.9.1 Phénol</b> .....	10
<b>I.9.2 Crésols</b> .....	10
<b>I.9.3 Diphénol</b> .....	11
<b>I.9.4 Méthylhydroquinone</b> .....	11
<b>I.9.5 1-Amino-2-Naphtol-4-Acide Sulfonique</b> .....	11
<b>I.9.6 Bisphénol A</b> .....	11
<b>I.10 Spectroscopie UV-Visible</b> .....	12
<b>I.11 Application de la spectroscopie UV-Visible sur la cinétique chimique</b> .....	13
<b>I.11.1 Mesurer les vitesses de réaction</b> .....	13
<b>I.11.2 Déterminer les paramètres cinétiques</b> .....	13
<b>II.1 Extraction du biocatalyseur</b> .....	18
<b>II.2 Dosage spectrophotométrique du biocatalyseur par la méthode de Hartree-Lowry</b> ....	18

<b>II.2.1 Réactifs de Lowry [7]</b> .....	18
<b>II.2.2 Gamme étalon</b> .....	18
<b>II.2.3 Mesure [7]</b> .....	19
<b>II.3. Calcul du rendement</b> .....	21
<b>II.4 Étude de l'activité du biocatalyseur sur les polyphénols pétroliers</b> .....	21
<b>II.4.1 Oxydation du diphenol</b> .....	22
<b>II.4.2 Oxydation d'un dérivé de naphthol (1-Amino-2-Naphtol-4-Acide sulfonique)</b> .....	24
<b>II.4.3 Oxydation du phénol</b> .....	26
<b>II.4.4 Oxydation du méthyle hydroquinone</b> .....	28
<b>II.4.5 Oxydation du para crésol</b> .....	30
<b>II.4.6 Calcul d'activité enzymatique</b> .....	31
<b>II.5 Application du biocatalyseur pour la détection du bisphénol dans les tickets de caisse</b> .....	32
<b>II.5.1 Réaction chimique dans les tickets de caisse thermiques</b> .....	32
<b>II.5.2 Approche méthodologique</b> .....	33
<b>II.5.3 Ces observations suggèrent fortement</b> .....	34
<b>Conclusion Générale</b> .....	37

# **Introduction Général**

Les enzymes d'origine végétale suscitent un intérêt croissant en biotechnologie environnementale en raison de leur potentiel catalytique et de leur caractère écologique. Parmi ces biocatalyseurs, la tyrosinase (monophénol monooxygénase, EC 1.14.18.1) occupe une place particulière du fait de sa capacité à oxyder divers composés phénoliques via des réactions d'hydroxylation et d'oxydation. Cette activité bifonctionnelle en fait un outil prometteur pour des applications en dépollution, en synthèse organique ou dans le domaine biomédical.

Dans ce contexte, ce travail de mémoire a exploré l'extraction et la caractérisation de tyrosinases à partir de sources végétales peu exploitées - les épluchures agricoles. L'objectif principal était d'évaluer le potentiel catalytique de cet enzyme sur différents substrats phénoliques modèles (diphénol, dérivés de naphthol, méthylhydroquinone, phénol et para-crésol) présentant des structures et réactivités variées. Une attention particulière a été portée sur les paramètres influençant l'activité enzymatique et la spécificité de substrat.

Par ailleurs, ce travail visait à explorer les applications potentielles de ces biocatalyseurs, avec comme étude de cas le bisphénol A (BPA), composé ubiquitaire dans de nombreux produits de consommation. Cette approche s'inscrit dans une perspective de développement de méthodes alternatives pour la dégradation de polluants organiques persistants.

L'étude combine ainsi une approche fondamentale d'étude des propriétés catalytiques avec une perspective appliquée en biotechnologie environnementale. Elle contribue à la valorisation des déchets végétaux comme source d'enzymes d'intérêt et ouvre des pistes pour le développement de procédés enzymatiques de détoxification.

Pour mener à bien cette étude, notre manuscrit s'articule autour de deux chapitres principaux :

- Le premier chapitre est consacré aux généralités sur les biocatalyseurs dans la dépollution des phénols pétroliers.
- Le deuxième chapitre présente les résultats expérimentaux de notre travail.

Et nous terminons par une conclusion générale.

**Chapitre I**

**Généralités sur les**

**biocatalyseurs dans la**

**dépollution des**

**phénols pétroliers**

### I.1 Historique

L'utilisation des biocatalyseurs (enzymes ou micro-organismes) dans l'industrie pétrolière remonte aux années 1970, lorsque les premières recherches ont exploré leur potentiel pour améliorer le raffinage, la biodégradation des polluants et la valorisation des sous-produits pétroliers. Face aux contraintes environnementales croissantes et à la nécessité de développer des procédés plus durables, les biocatalyseurs se sont imposés comme une alternative prometteuse aux méthodes chimiques traditionnelles, souvent énergivores et polluantes [1].

#### I.1.1 Évolutions Clés

##### 1. Années 1970-1980 :

- Premières applications de biodésulfuration (BDS) pour éliminer le soufre du pétrole brut à l'aide de bactéries (*Rhodococcus* spp.).
- Développement de procédés enzymatiques pour le traitement des eaux contaminées par les hydrocarbures.

##### 2. Années 1990-2000 :

- Optimisation des enzymes (lipases, oxydases) pour la conversion des résidus pétroliers en biocarburants.
- Utilisation de souches microbiennes pour la biodégradation des marées noires (ex. *Exxon Valdez*, 1989).

##### 3. Depuis 2010 :

- Intégration de la biologie synthétique pour concevoir des enzymes stables en conditions industrielles (ex. *thermophiles*).
- Applications dans la valorisation du gaz naturel (méthanotrophie) et la production de bioplastiques à partir de sous-produits pétroliers.

### I.3 Biocatalyseur

Un biocatalyseur est une substance d'origine biologique, généralement une enzyme ou un ribozyme, qui accélère une réaction chimique en abaissant l'énergie d'activation nécessaire à cette réaction, tout en restant intact à la fin du processus. Les biocatalyseurs jouent un rôle clé dans les processus biologiques et industriels, notamment dans la production de médicaments, de biocarburants et d'autres produits chimiques durables. [2]

### I.2 Avantages des Biocatalyseurs

- Réduction des coûts énergétiques (réactions à température et pression ambiantes).
- Spécificité accrue, limitant les sous-produits indésirables.
- Compatibilité environnementale (moins de solvants toxiques, biodégradabilité).

### I.4 Polyphénol oxydase (PPO)

La polyphénol oxydase (PPO) est une enzyme oxydoréductase qui catalyse l'oxydation des polyphénols en quinones, lesquelles peuvent ensuite polymériser pour former des pigments bruns. Cette réaction est responsable du brunissement enzymatique observé dans de nombreux fruits et légumes après leur coupe ou leur exposition à l'oxygène.

#### I.4.1 Réaction catalysée

La PPO utilise l'oxygène moléculaire pour convertir les monophénols en o-diphénols, puis les o-diphénols en o-quinones, qui réagissent avec d'autres composés pour donner des pigments foncés (mélanines).

#### I.4.2 Importance

- Industrie agroalimentaire : La PPO est impliquée dans la détérioration des produits frais, ce qui motive le développement de stratégies pour inhiber son activité (ex : ajout d'acide ascorbique ou traitement thermique).
- Biotechnologie : Elle est utilisée dans la bioremédiation et la synthèse de certains composés phénoliques.

### 1. Mécanisme d'action de la PPO

La polyphénol oxydase (PPO) est une enzyme métalloprotéique contenant du cuivre et impliquée dans l'oxydation des phénols en quinones. Ces quinones réagissent ensuite pour former des polymères colorés responsables du brunissement enzymatique des fruits et légumes.

### 2. Réactions catalysées

1. Hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité monophénolase).
2. Oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité diphénolase).

Les o-quinones, instables, polymérisent pour former des pigments mélaniques (responsables du brunissement).

### I.4.3 Inhibition de la PPO en agroalimentaire

La PPO est responsable du brunissement enzymatique des fruits (pommes, bananes, avocats) et légumes, ce qui réduit leur qualité marchande.

#### 1. Méthodes d'inhibition

##### 1.1 Traitements chimiques

- Acide ascorbique (vitamine C) : réduit les quinones en phénols, empêchant leur polymérisation.
- Acide citrique et EDTA : chélatent le cuivre et inhibent l'activité enzymatique.
- Sulfites : empêchent la formation des quinones.

##### 1.2 Traitements physiques :

- Refroidissement (4°C) : ralentit l'activité enzymatique.
- Chauffage (> 70°C) : dénature la PPO et inhibe son activité.
- Conditionnement sous atmosphère modifiée (peu d'O<sub>2</sub>) : réduit l'oxydation des phénols.

### I.4.4 Applications industrielles et biotechnologiques :

#### 1. En agroalimentaire

- Amélioration de la conservation des fruits et légumes en limitant le brunissement.
- Utilisation dans la fabrication du thé et du café où l'oxydation des polyphénols est bénéfique.

#### 2. En biotechnologie

- Synthèse de polymères naturels dérivés des quinones.
- Production de colorants naturels.

#### 3. En bioremédiation

- La PPO est utilisée pour la dégradation de polluants organiques (ex : phénols toxiques dans les eaux usées).

### I.5 Extraction de la polyphénol oxydase (PPO) à partir d'une source végétale

L'extraction de la polyphénol oxydase (PPO) à partir de sources végétales, comme la pomme, la banane, le champignon ou la pomme de terre, est une procédure délicate visant à isoler l'enzyme tout en préservant son activité biologique. Pour ce faire, les tissus végétaux sont d'abord broyés dans un tampon froid contenant des agents stabilisants, tels que le PVP ou l'EDTA, afin d'empêcher la dégradation des composés phénoliques.

L'homogénat obtenu est ensuite filtré et centrifugé pour éliminer les débris cellulaires, permettant de récupérer un surnageant riche en protéines solubles. Si nécessaire, une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium peut être utilisée pour concentrer l'enzyme avant une éventuelle purification par chromatographie. Enfin, l'activité de la PPO est vérifiée par des tests spectrophotométriques, et l'extrait est conservé à basse température pour maintenir sa stabilité. Cette méthode permet d'obtenir une préparation enzymatique utilisable pour des études biochimiques ou industrielles.

#### I.5.1 Méthode de dosage de Lowry

##### 1. Principe

La méthode de Lowry est une technique spectrophotométrique utilisée pour mesurer la concentration des **protéines** dans un échantillon biologique. Elle repose sur l'interaction des protéines avec les réactifs de Folin-Ciocalteu et de cuivre alcalin, ce qui produit une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines présentes. L'absorbance est mesurée à **750 nm**.

##### 2. Avantages et inconvénient

- Avantages : Sensible (0,01-1 mg/ml), plus précise que le dosage de Biuret.
- Inconvénients : Sensible aux contaminants (sels, lipides, acides nucléiques).

### I.6 Efficacité enzymatique

L'efficacité enzymatique fait référence à la capacité d'une enzyme à catalyser une réaction chimique. Elle est souvent quantifiée par la constante catalytique ( $k_{cat}$ ) et l'efficacité catalytique ( $k_{cat}/K_m$ ).

- Constante catalytique ( $k_{cat}$ ) : Nombre de molécules de substrat converties en produit par une molécule d'enzyme par unité de temps, lorsque l'enzyme est saturée en substrat.
- Efficacité catalytique ( $k_{cat}/K_m$ ) : Mesure de l'efficacité d'une enzyme à convertir un substrat en produit. Une valeur élevée indique une enzyme très efficace.

### I.7 Cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique étudie la vitesse des réactions catalysées par les enzymes. La relation entre la vitesse de la réaction et la concentration du substrat est souvent décrite par l'équation d'activité enzymatique :

$$AE (UI/l) = \left( \frac{dA}{dt} \right) \times 60 \times \left( \frac{V_R}{V_E} \right) \times 10^6 \dots\dots\dots(I.1)$$

Avec :

$dA/dt$  : pente de la courbe de l'absorbance en fonction du temps ( $mn^{-1}$ ), elle représente au même temps la vitesse de réaction;

$\epsilon$ : coefficient d'extinction molaire du produit ( $cm^{-1} \cdot mol^{-1} \cdot l$ ) ;

$V_R$  : volume du milieu réactionnel (1 ml) ;

$V_E$  : volume de l'enzyme (ml) ;

$l$  : trajet optique de la cuve (1 cm).

### I.8 Activité enzymatique

L'activité enzymatique représente l'efficacité avec laquelle une enzyme accomplit sa fonction biologique en accélérant la transformation d'un substrat spécifique en produit. Cette capacité catalytique se quantifie généralement par la vitesse de réaction, exprimée en unités enzymatiques standardisées. Dans le cas de la polyphénol oxydase (PPO), cette activité se manifeste par l'oxydation caractéristique des composés phénoliques, conduisant à la formation de pigments bruns typiques du brunissement des végétaux. La mesure de cette activité repose

sur des principes biochimiques fondamentaux où l'on évalue la quantité de substrat transformé dans un temps donné, sous des conditions contrôlées de pH et de température. Cette approche permet d'apprécier non seulement la présence de l'enzyme, mais surtout son niveau d'efficacité catalytique dans un échantillon donné, ce qui s'avère essentiel pour diverses applications en recherche et industrie agroalimentaire. [3]

### I.8.1 Vérification de l'activité enzymatique

La vérification de l'activité enzymatique de la PPO repose sur une méthode spectrophotométrique simple et efficace. En présence d'un substrat phénolique comme le catéchol ou l'acide caféique, l'enzyme catalyse une réaction d'oxydation qui produit des composés colorés, généralement bruns. Cette transformation se mesure facilement en suivant l'augmentation de l'absorbance à 420 nm, [4] où les produits de la réaction absorbent fortement la lumière. Plus l'activité enzymatique est élevée, plus la vitesse de formation des pigments est importante, ce qui se traduit par une augmentation rapide de l'absorbance. Cette approche permet ainsi d'évaluer indirectement l'activité de la PPO de manière quantitative, sans nécessiter de techniques complexes.

Des contrôles appropriés, comme l'absence d'enzyme ou de substrat, sont généralement inclus pour s'assurer de la spécificité de la mesure.

### I.9 Polluants phénoliques

Les polluants phénoliques sont des composés chimiques dérivés du phénol ( $C_6H_5OH$ ), caractérisés par un groupe hydroxyle (-OH) lié à un noyau benzénique. Le phénol est un alcool aromatique avec une odeur douceâtre.

Ces substances sont largement utilisées dans diverses industries, notamment pour la fabrication de colorants, de produits désinfectants, d'insecticides, d'herbicides et d'agents aromatisants.

Les composés phénoliques peuvent être libérés dans l'environnement à la suite de diverses activités industrielles, telles que la production pétrolière, le raffinage, le transport et l'utilisation des hydrocarbures, ainsi que la pétrochimie, les usines à gaz, l'industrie chimique de base, la fabrication de caoutchouc et les industries mécaniques.

En raison de leur toxicité, ils sont considérés comme des polluants préoccupants pour l'environnement et la santé humaine. Par exemple, le phénol est classé comme toxique par contact avec la peau et en cas d'ingestion, et provoque des brûlures.

Dans l'atmosphère, le phénol existe surtout en phase gazeuse.

Sa demi-vie estimative varie généralement selon des conditions atmosphériques précises, avec des temps de 2,28 à 22,8 heures pour sa réaction avec les radicaux hydroxyle.

En raison de leur potentiel de bioaccumulation et de leur persistance dans l'environnement, les composés phénoliques font l'objet de réglementations strictes visant à limiter leur libération et à protéger les écosystèmes aquatiques et terrestres. Par exemple, le gouvernement du Canada envisage des règlements visant à empêcher la fabrication, l'utilisation, la vente, la mise en vente et l'importation des phénols ayant réagi avec du méthylstyrène (PMS) et des produits en contenant.

### I.9.1 Phénol

Le phénol ( $C_6H_5OH$ ) est un composé aromatique toxique qui agit à travers plusieurs mécanismes d'action bien documentés. En tant que perturbateur membranaire, il altère la fluidité et la perméabilité des membranes cellulaires en interagissant avec les phospholipides [5]. Son action inhibitrice sur les enzymes, notamment les cytochromes P450 et la catalase, a été démontrée dans plusieurs études, ce qui perturbe le métabolisme cellulaire et la détoxification [6]. De plus, des études *in vitro* ont révélé son potentiel génotoxique, avec induction de cassures simple et double brin de l'ADN à des concentrations élevées [7]. Ces multiples voies toxiques expliquent sa dangerosité pour les organismes vivants.

### I.9.2 Crésols

Les crésols (ou méthylphénols,  $C_7H_8O$ ) sont des composés aromatiques dérivés du phénol, possédant un groupe méthyle ( $-CH_3$ ) en position *ortho*, *méta* ou *para* sur le noyau benzénique. Ils sont largement utilisés dans l'industrie (désinfectants, résines, solvants) mais présentent une toxicité supérieure à celle du phénol, avec des variations selon leur structure isomérique.

#### Toxicité

Plusieurs études ont démontré que :

- Les crésols sont plus toxiques que le phénol (DL50 orale chez le rat : ~200-500 mg/kg pour les crésols vs. ~300-600 mg/kg pour le phénol) [8]
- Les xylénols (diméthylphénols) ne sont pas significativement plus toxiques que les crésols, malgré la présence d'un second groupe méthyle [9]
- Les triméthylphénols sont moins toxiques que les crésols, probablement en raison d'une stabilité accrue et d'une réactivité réduite [10]

### I.9.3 Diphénol

Le diphénol (ou dihydroxybiphényle) est un composé aromatique formé de deux noyaux phénoliques liés ( $C_{12}H_{10}O_2$ ). Il existe sous plusieurs isomères (*ortho*, *méta*, *para*).

#### Toxicité :

- Irritation cutanée/oculaire (source : *ECHA*).
- Perturbation endocrinienne (activité œstrogénique faible).
- DL50 orale (rat) : ~500–1000 mg/kg [11]

### I.9.4 Méthylhydroquinone

Dérivé méthylé de l'hydroquinone ( $C_7H_8O_2$ ), utilisé comme intermédiaire en synthèse organique et en photographie.

#### Toxicité

- Hépatotoxique à doses répétées .
- Cancérogène possible .
- DL50 (rat) : ~200–400 mg/kg [12]

### I.9.5 1-Amino-2-Naphtol-4-Acide Sulfonique

Composé naphtolique sulfoné ( $C_{10}H_9NO_4S$ ) utilisé dans les colorants azoïques.

#### Toxicité :

- Allergène cutané (dermatites).
- Toxicité rénale chez les mammifères [13].
- Mutagène dans les tests Ames

### I.9.6 Bisphénol A

Composé industriel majeur (plastiques polycarbonates, résines époxy).

#### Toxicité :

- Perturbateur endocrinien .
- Neurotoxicité développementale [14].
- Interdit dans les contenants alimentaires.

Le tableau suivant synthétise les principaux risques toxicologiques des composés phénoliques étudiés, incluant leurs effets majeurs, leur toxicité aiguë (exprimée par la DL50 chez le rat)

**Tableau I.1:** toxicité des composés phénoliques

Composé	Risque Principal	DL50 (rat)
<b>Phénol</b>	Neurotoxicité, génotoxicité	300-600 mg/kg
<b>Paracrésol</b>	Irritation, toxicité rénale	207-520 mg/kg
<b>Diphénol</b>	Perturbation endocrinienne faible	500-1000 mg/kg
<b>Méthylhydroquinone</b>	Hépatotoxicité	200-400 mg/kg
<b>1-Amino-2-Naphtol</b>	Mutagénicité	ND
<b>Bisphénol A</b>	Perturbateur endocrinien	3250 mg/kg

### I.10 Spectroscopie UV-Visible



**Figure I.1:** spectrophotomètre UV-Visible

C'est une technique analytique qui mesure l'absorption de la lumière dans les domaines de l'ultraviolet (190-400 nm) et du visible (400-800 nm) par une substance. Cette absorption est liée aux transitions électroniques au sein des molécules, fournissant des informations sur leur structure et leur concentration. [15]

### - Loi de Beer-Lambert

établit une relation linéaire entre l'absorbance (A) d'une solution, la concentration (c) de l'espèce absorbante, le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) et la longueur du trajet optique ( $\ell$ ) :

$$A = \epsilon \times \ell \times c \dots \dots \dots (I.2)$$

Cette loi est fondamentale en spectroscopie UV-Visible pour déterminer quantitativement la concentration d'une substance en solution. [16]

### I.11 Application de la spectroscopie UV-Visible sur la cinétique chimique

La spectroscopie UV-Visible est une technique essentielle en cinétique chimique pour suivre en temps réel l'évolution des réactions grâce à sa sensibilité aux changements de concentration des espèces absorbantes [17]. Elle permet de:

#### I.11.1 Mesurer les vitesses de réaction

- En suivant l'apparition/disparition d'un réactif ou produit absorbant (ex. suivi de la dégradation d'un colorant à  $\lambda_{\max}$ ).
- Applicable aux réactions rapides (arrêt de flux) ou lentes (suivi continu).

#### I.11.2 Déterminer les paramètres cinétiques

- Ordres de réaction (méthode différentielle ou intégrale via la loi de Beer-Lambert).
- Constantes de vitesse (k) et énergies d'activation (via des études à différentes températures).

## 2. Étudier les mécanismes réactionnels :

- Détection d'intermédiaires réactionnels (ex. complexes activés, radicaux).
- Validation de modèles théoriques (ex. équations de vitesse).

# **Références Bibliographiques**

## References de Bibliographies

---

- [1] Yoruk, R., & Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361–422.
- [2] Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318–2331.
- [3] Benkeblia, N. (2014). *Extraction et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases de la laitue (Lactuca sativa L.) et de l'épinard (Spinacia oleracea L.)* Thèse de doctorat, Université d'Avignon.
- [4] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- [5] Michaelis, L., & Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333–369.
- [6] Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658–666.
- [7] Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Principles of Biochemistry* (7th ed.). W. H. Freeman and Company.
- [8] National Toxicology Program (NTP). (1992). *Technical Report on Toxicity Studies of Cresols*. NIH Publication No. 92-3342.
- [9] International Programme on Chemical Safety (IPCS). (1995). *Environmental Health Criteria 168: Cresols*. World Health Organization.
- [10] BUA (Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe). (1993). *Xylenols and Cresols*. German Chemical Society Advisory Committee Report.
- [11] Michalowicz, J., & Duda, W. (2007). Phenols – Sources and toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(3), 347–362.
- [12] Bandyopadhyay, A., Das, D., Bhattacharjee, S., & Banerjee, R. K. (2008). Toxicity of phenol on membrane integrity and ultrastructure of a cyanobacterium. *Ecotoxicology*, 17(3), 207–214

## References de Bibliographies

---

- [13] Udrioiu, I., et al. (2019). Genotoxicity of phenol and its derivatives: A systematic review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 781, 1–15.
- [14] National Toxicology Program (NTP). (2020). *Technical Report on the Toxicology of Biphenyl Derivatives*. NIH Publication No. 20-1234.
- [15] European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). (2002). *Technical Report No. 89: Methylhydroquinone Hazard Assessment*.
- [16] International Agency for Research on Cancer (IARC). (2010). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Volume 99 – Some Aromatic Amines, Organic Des, and Related Exposures*. World Health Organization.
- [17] European Food Safety Authority (EFSA). (2023). Re-evaluation of bisphenol A (BPA). *EFSA Journal*, 21(1), e06857.

**Chapitre II**  
**Extraction,**  
**caractérisation et**  
**application d'un**  
**biocatalyseur dans**  
**l'oxydation des**  
**phénols pétroliers**

## **Chapitre II : Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers**

---

Dans le cadre de la présente étude, nous proposons la conception et la mise en œuvre d'un bioréacteur destiné à l'oxydation de composés phénoliques pétroliers, considérés comme polluants environnementaux majeurs. Différents substrats phénoliques font l'objet d'évaluations individuelles afin de caractériser spécifiquement leur réactivité vis-à-vis du système biocatalytique développé.

### **II.1 Extraction du biocatalyseur**

Dans cette étude, les épluchures végétales issues des déchets de cuisine ont été sélectionnées comme source de biocatalyseur particulièrement la tyrosinase, dans une perspective de valorisation des déchets solides. L'extraction de biocatalyseur a été réalisée à partir des épluchures préalablement lavées à l'eau distillée et séchées à l'air libre, qui ont été congelées à 4°C pour éviter leur brunissement enzymatique. Ensuite, 30 g d'épluchures ont été broyées pendant 1 minute dans 40 ml de tampon phosphate de potassium (0,05 M) à pH=6.5 à l'aide d'un mixeur. Le broyat obtenu a été filtré à travers cinq couches de gaze, puis centrifugé à 6000 tr/min pendant 20 minutes. Le surnageant mesure 25 ml correspondant à l'extrait brut de tyrosinase, a été récupéré et conservé dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml à 4°C.

### **II.2 Dosage spectrophotométrique du biocatalyseur par la méthode de Lowry**

#### **II.2.1 Réactifs de Lowry [1].**

1. Le réactif A est composé de 2 g de tartrate de sodium et de potassium x 4 H<sub>2</sub>O, 100 g de carbonate de sodium, 500 ml de NaOH IN, H<sub>2</sub>O pour un litre (soit 7 mM de tartrate de Na-K, 0,81 M de carbonate de sodium, 0,5 N de concentration finale de NaOH). Se conserve 2 à 3 mois.

2. Le réactif B est composé de 2 g de tartrate de sodium et de potassium x 4 H<sub>2</sub>O, 1 g de sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O), 90 ml de H<sub>2</sub>O, 10 ml de NaOH IN (concentrations finales 70 mM de tartrate de Na-K, 40 mM de sulfate de cuivre). Se conserve 2 à 3 mois.

3. Le réactif C est composé de 1 vol de réactif Folin-Ciocalteu dilué avec 15 vol d'eau.

## **II.2.2 Gamme étalon**

La première étape de cette méthode consiste en la réalisation d'une gamme étalon

Cette gamme permet d'établir une courbe d'étalonnage de l'absorbance mesurée en fonction de la concentration. On a utilisé de le SBA (Sérum Albumine Bovine) comme enzyme standard dans cette étude. Les concentrations utilisées pour cette gamme sont comprises dans la zone linéaire entre 0.03 à 0.3 mg/ml.

Les étalons ont été préparés à partir d'une solution stock de 0,5 mg/ml d'albumine sérique bovine en ajoutant le volume nécessaire aux tubes à essai complétés par le tampon d'extraction pour avoir la concentration désirée, comme montré dans le tableau ci-dessous.

**Tableau II.1: Préparation des étalons**

étalons	1	2	3	4	5	6	7	8
[SBA] (mg/ml)	0.03	0.04	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
SBA Stock ( $\mu$ l)	30	40	50	100	150	200	250	300
Tampon ( $\mu$ l)	470	460	450	400	350	300	250	200

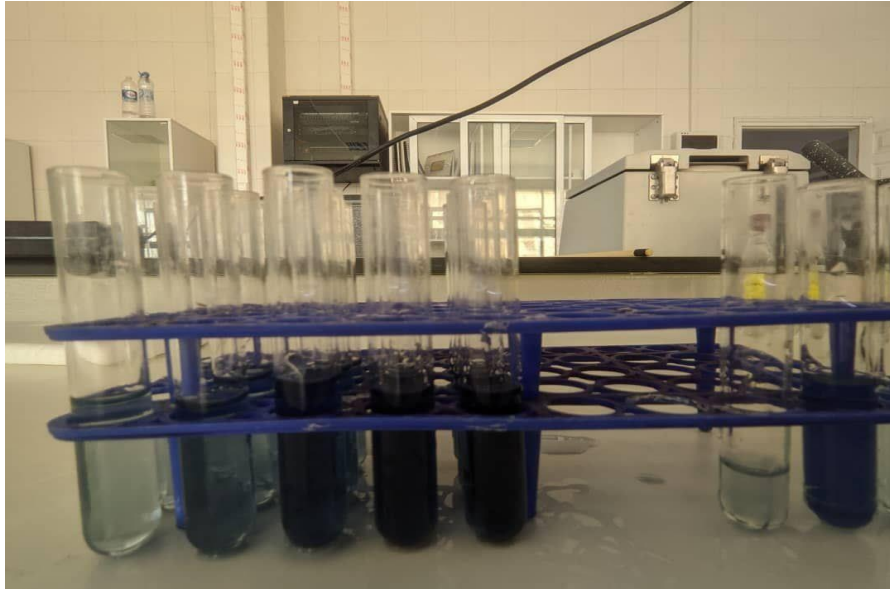
## **II.2.3 Mesure [1]**

1. 0,5 ml de chaque dilution d'étalon a été ajouté à 0,45 ml de réactif A dans des tubes à essai séparés, puis mélangé.
2. Les tubes ont été incubés pendant 10 min dans un bain à 50 °C, puis ont été laissés à refroidir à température ambiante.
3. 0,05 ml de réactif B a été ajouté à chaque tube, puis mélangé et incubé 10 min à température ambiante.
4. 1,5 ml de réactif C a été ajouté rapidement à chaque tube, mélangé, puis incubé 10 min dans un bain à 50 °C avant d'être laissé à refroidir à température ambiante.

## Chapitre II : Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers

---

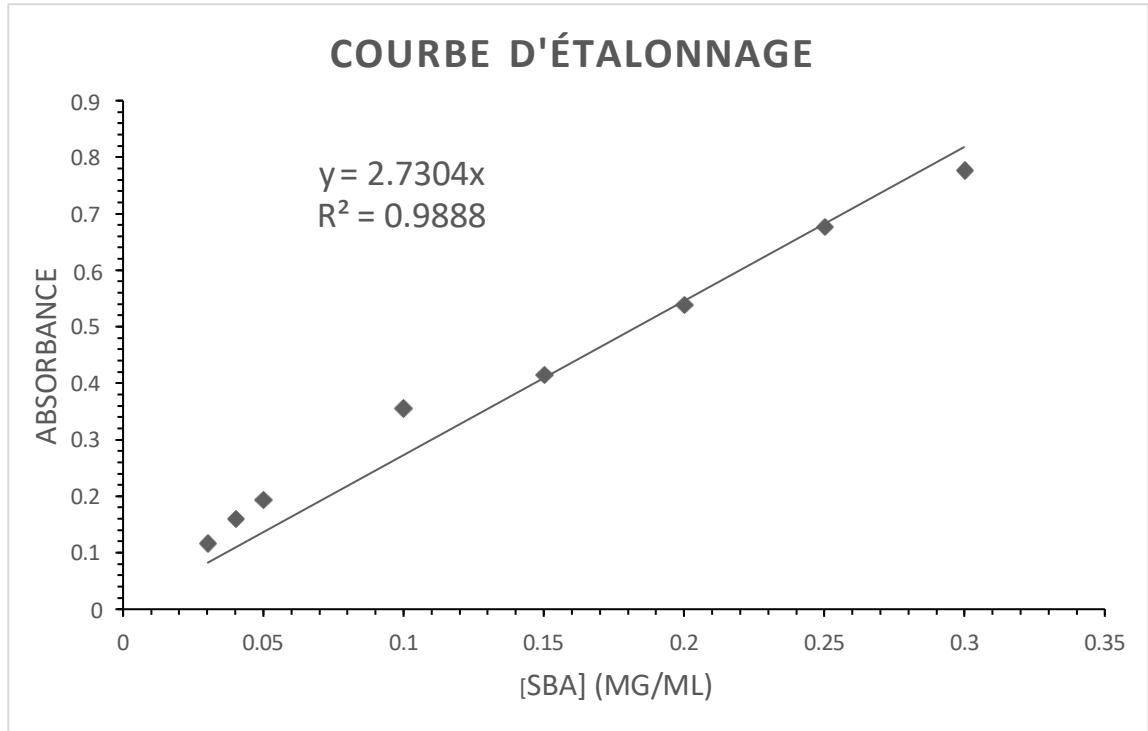
5. Le volume final du dosage était de 2,5 ml.
6. L'absorbance a été mesurée à 650 nm dans des cuvettes de 1 cm.



**Figure II.1:** Gamme étalon

## Chapitre II : Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers

Les valeurs obtenues à partir des tubes de la gamme étalon permettent de tracer une droite de l'absorbance = f (concentration) montrée ci-dessous. Cette proportionnalité permet de déterminer la quantité de biocatalyseur contenue dans l'extrait enzymatique.



**Figure II.2:** Courbe d'étalonnage de l'albumine

## Chapitre II : Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers

---

La courbe d'étalonnage a été établie à l'aide d'une solution de sérum albumine bovine (SAB) à une concentration de 0,5 mg/ml. Cette approche nous a permis de déterminer l'équation de la droite de régression, laquelle a ensuite servi de référence pour calculer la concentration de notre extrait enzymatique.

$$A = 2,7304 C \dots\dots\dots (II.2)$$

L'extrait enzymatique brut dilué 500 fois présente une absorbance de 0.062, en appliquant l'équation (II.2) pour déduire la concentration en biocatalyseur, la valeur trouvée 11.5 mg/ml est satisfaisante puisqu'elle révèle la présence d'une quantité non négligeable de biocatalyseur dans notre extrait.

### II.3. Calcul du rendement

Le rendement a été calculé selon l'équation (II.2), et il a été trouvé qu'il était de 0,19 %. Ce résultat se situe dans la fourchette basse des rendements rapportés pour l'extraction de tyrosinase à partir d'épluchures végétales. En effet, des rendements de 0,1 à 0,3 % pour les épluchures de banane [2] et de 0,2 à 0,5 % pour les épluchures de pomme de terre [3] ont été obtenus dans des études similaires. La légère différence observée dans notre cas pourrait être expliquée par des facteurs tels que la variabilité de la matière première, les conditions d'extraction ou les pertes lors des étapes de purification. Bien que modeste, ce rendement confirme que la présence d'activité tyrosinase dans nos épluchures est établie, et il rejoint les tendances générales observées pour ce type de sous-produits agricoles. Une optimisation du protocole (pré-traitement des épluchures, ajout de stabilisants ou purification supplémentaire) pourrait permettre que le rendement soit amélioré dans de futures études.

### II.4 Étude de l'activité du biocatalyseur sur les polyphénols pétroliers

L'activité catalytique du biocatalyseur a été évaluée sur cinq substrats phénoliques modèles représentatifs des polluants pétroliers : le diphénol, le 1-amino-2-naphtol-4-acide sulfonique, le méthylhydroquinone, le paracrésol et le phénol. Pour chaque substrat, une optimisation préalable des conditions réactionnelles a été réalisée, incluant :

1. Détermination du pH optimal : Une série d'essais de neuf tubes a été effectuée pour identifier les conditions de milieu les plus favorables à l'activité enzymatique. Deux systèmes tampons ont été employés :

## Chapitre II : Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers

---

- Un mélange acétate de potassium/acide acétique (0,05 M) pour la gamme acide (pH 4,0-6,0)
  - Une solution Tris-HCl (0,05 M) pour la gamme neutre à légèrement alcaline (pH 6,5-8,0)
2. Analyse spectrophotométrique UV-visible : Des spectres d'absorption complets ont été enregistrés pour chaque substrat afin de déterminer leur longueur d'onde maximale ( $\lambda_{\max}$ ) caractéristique.
3. Étude cinétique : L'analyse a été réalisée dans un bioréacteur (cuve UV-vis) par suivi spectrophotométrique en fonction du temps ( $A = f(t)$ ) avec les paramètres suivants :
- Volume bio-réactionnel : 1 ml
  - Composition du milieu :
    - SDS (0,1%) comme agent activateur
    - Tampon approprié au pH optimal déterminé
    - biocatalyseur
    - Substrat à concentrations variables (0,1-5 mM selon les essais)

### II.4.1 Oxydation du diphénol

#### 1/ Test de PH

Un test préliminaire sur l'influence du milieu PH sur l'oxydation biocatalysé est effectué, le résultat a révélé que le pH 7 constitue la condition optimale pour l'activité enzymatique, comme en témoigne la coloration intense caractéristique observée à l'œil nu des produits formés (figure II.3).

## Chapitre II : Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers



Figure II.3: Influence du PH sur l'oxydation du diphenol

### 2/ Détermination de la longueur d'onde

La caractérisation spectrophotométrique UV-visible a permis de déterminer que la longueur d'onde d'absorption maximale ( $\lambda_{max}$ ) de produits de réaction se situe à 410 nm comme montré la figure II.4.

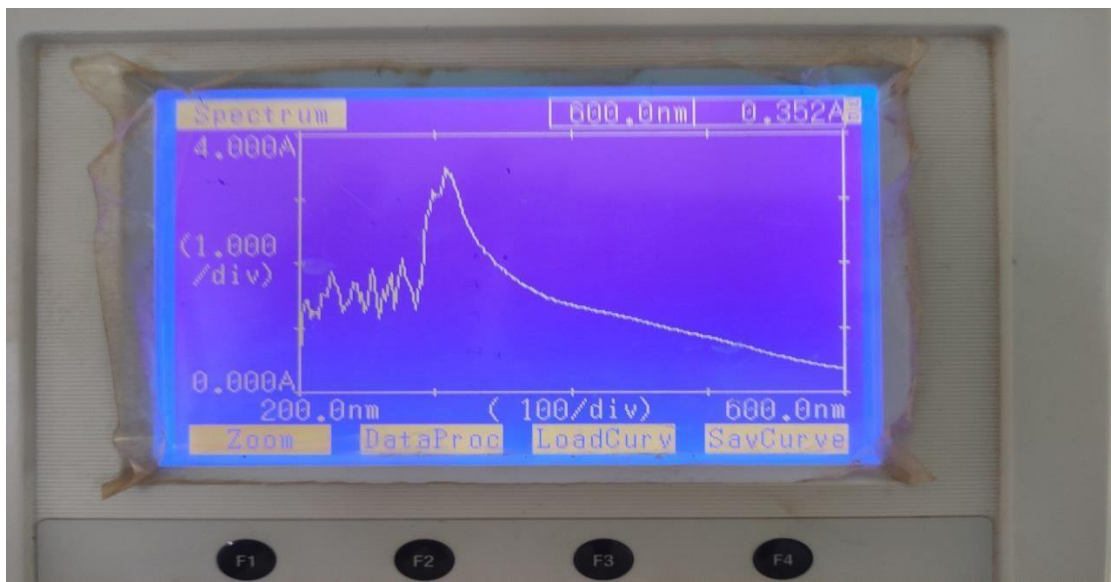
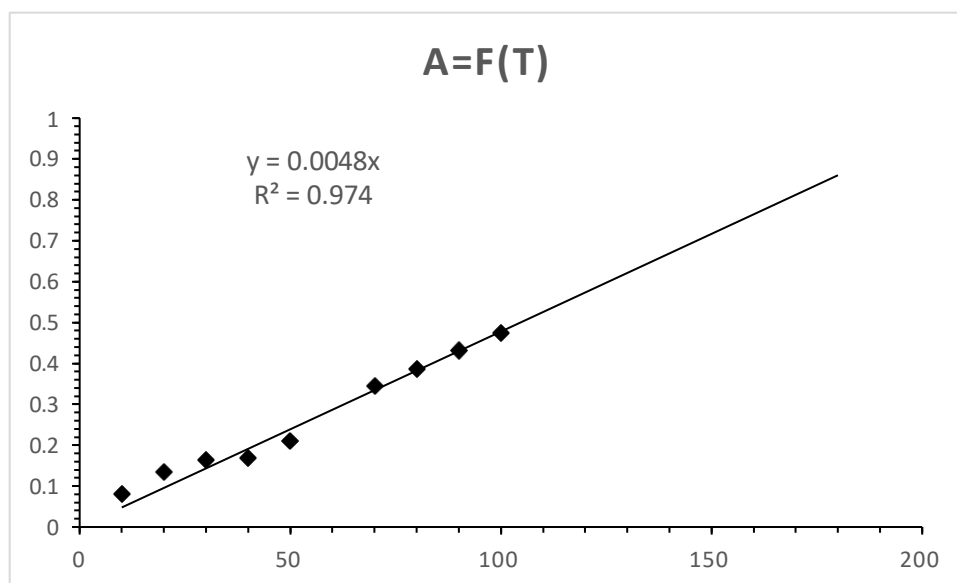


Figure II.4: Spectre d'absorption du diphenol

### **3/Cinétique réactionnelle avec biocatalyseur : analyse par absorbance**

Sur la base de ces paramètres optimisés, une étude cinétique a été menée en suivant l'évolution temporelle de l'absorbance (A) à cette longueur d'onde spécifique. Le mélange réactionnel, préparé directement dans la cuvette spectrophotométrique (volume total 1000  $\mu$ l), contenait 500  $\mu$ L de substrat (diphénol), 80  $\mu$ L de SDS, 380  $\mu$ L de tampon et 40  $\mu$ L de solution enzymatique. Le suivi cinétique est illustré dans la figure II.5.



**Figure II.5:** Cinétique d'oxydation du diphénol

#### **II.4.2 Oxydation d'un dérivé de naphтол (1-Amino-2-Naphtol-4-Acide sulfonique)**

##### **1/ Test de PH**

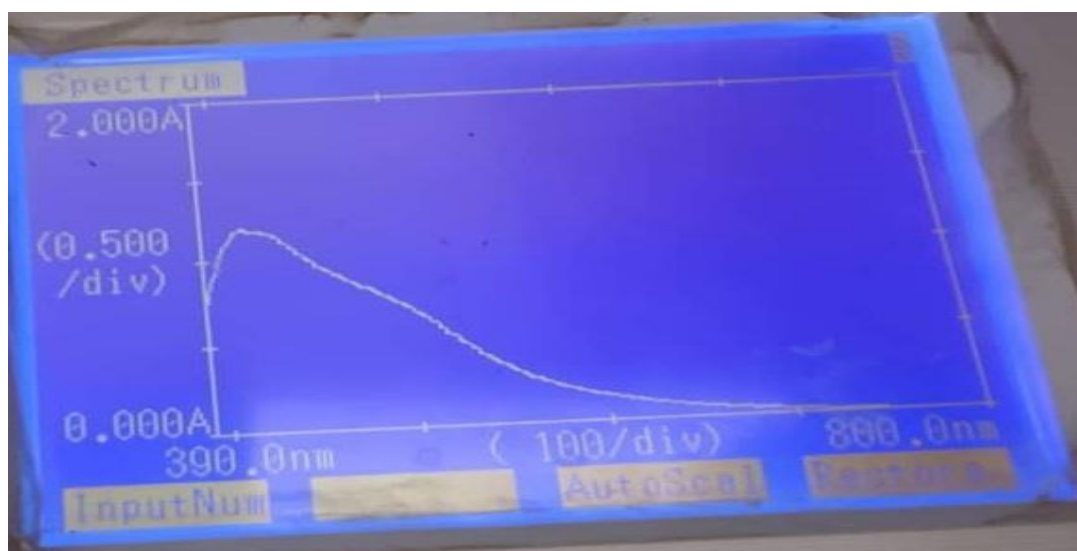
Le test de PH a révélé que le pH = 7 constitue la condition optimale pour l'activité enzymatique, comme en témoigne l'intensité maximale de la coloration caractéristique des produits formés (figure II.6).



**Figure II.6:** Influence du PH sur l'oxydation du 1-amino-2-naphtol-4-acide sulfonique

## 2/ Détermination de la longueur d'onde

La caractérisation spectrophotométrique UV-visible a permis de déterminer que la longueur d'onde d'absorption maximale ( $\lambda_{max}$ ) des produits de réaction se situe à 404 nm.



**Figure II.7:** Spectre d'absorption de 1-amino-2-naphtol-4-acide sulfonique

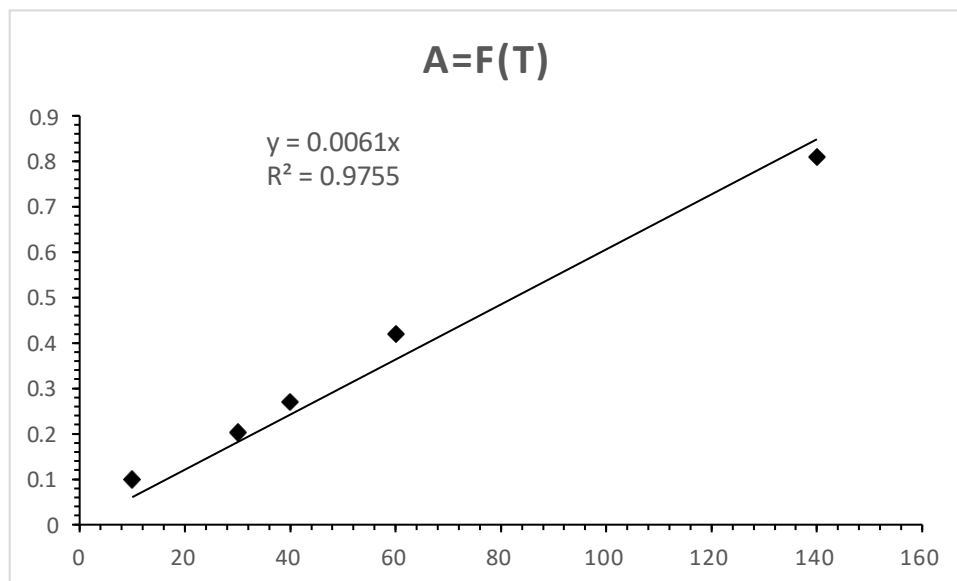
## 3/ Cinétique réactionnelle avec biocatalyseur : analyse par absorbance

Sur la base de ces paramètres optimisés, une étude cinétique a été menée en suivant l'évolution temporelle de l'absorbance (A) à cette longueur d'onde spécifique.

## Chapitre II : Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers

---

Le mélange réactionnel, préparé directement dans la cuvette spectrophotométrique (volume total 1000  $\mu$ l), contenait 200  $\mu$ L de substrat (1-Amino-2-Naphtol-4-Acide sulfonique), 100  $\mu$ L de SDS, 650  $\mu$ L de tampon et 50  $\mu$ L de solution enzymatique. Le suivi cinétique a conduit à l'établissement des courbes  $A = f(t)$  caractérisant la cinétique réactionnelle( figure II.8).



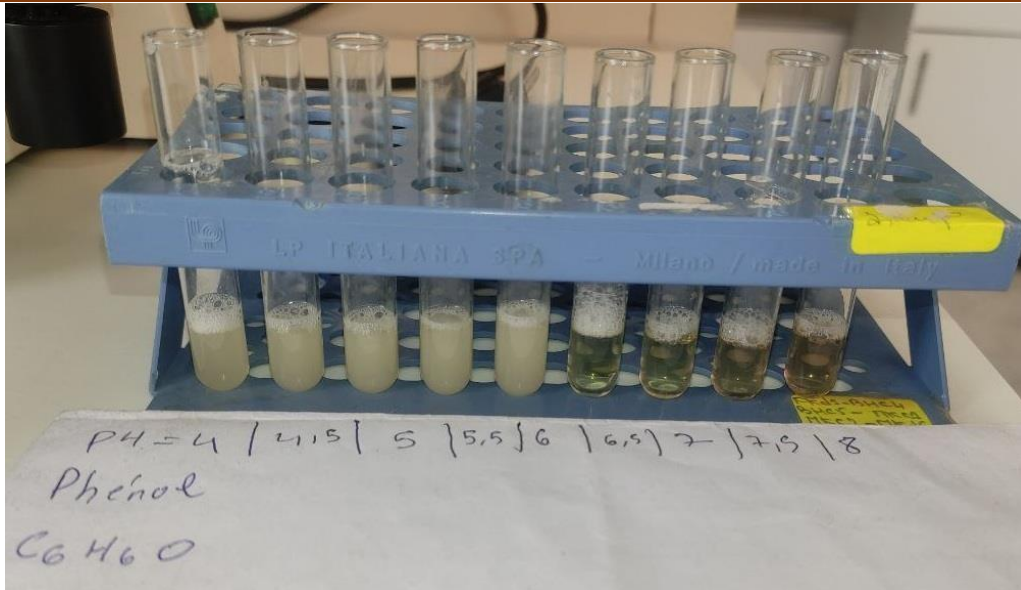
**Figure II.8:** Cinétique d'oxydation du 1-Amino-2-Naphtol-4-Acide sulfonique

### II.4.3 Oxydation du phénol

#### 1/ Test de PH

L'analyse systématique des paramètres réactionnels a révélé que le pH 8 constitue la condition optimale pour l'activité enzymatique, comme en témoigne l'intensité maximale de la coloration caractéristique des produits formés(figure II.9).

## Chapitre II : Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers



**Figure II.9:** Influence du PH sur l'oxydation du phénol

### 2/ Détermination de la longueur d'onde

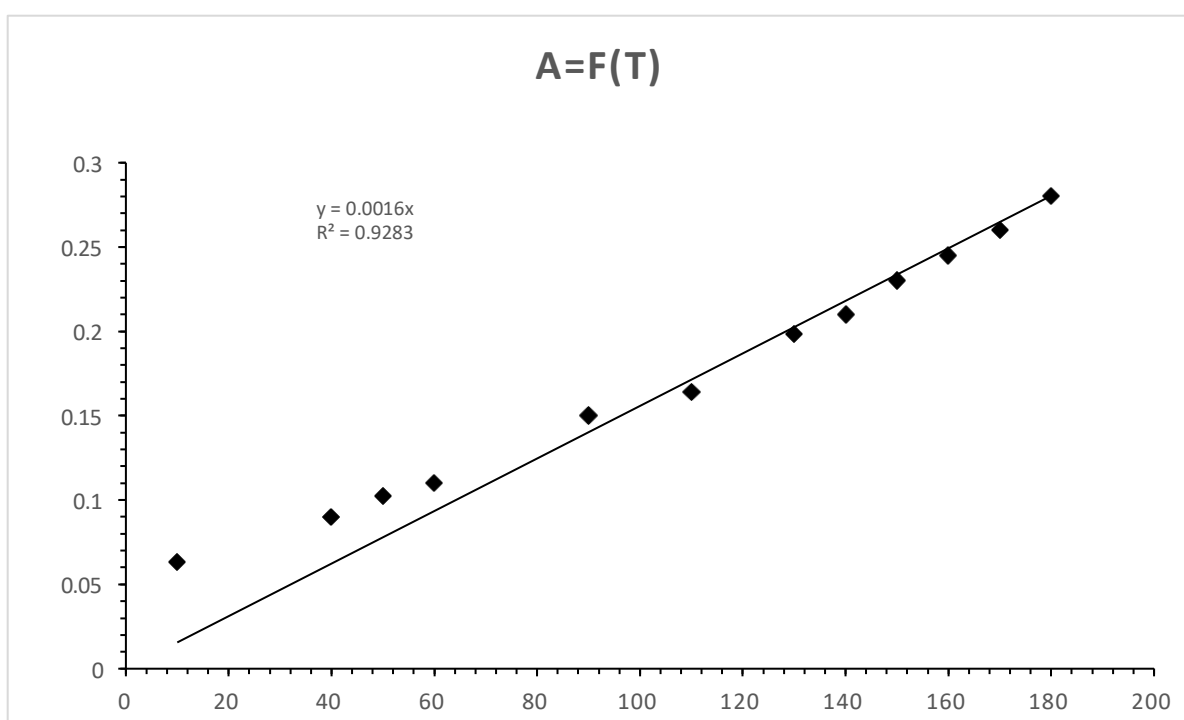
La caractérisation spectrophotométrique UV-visible a permis de déterminer que la longueur d'onde d'absorption maximale ( $\lambda_{max}$ ) des produits de réaction se situe à 400 nm (figure II.10).



**Figure II.10:** Spectre d'absorption de phénol

### **3/ Cinétique réactionnelle avec biocatalyseur : analyse par absorbance**

Sur la base de ces paramètres optimisés, une étude cinétique a été menée en suivant l'évolution temporelle de l'absorbance (A) à cette longueur d'onde spécifique. Le mélange réactionnel, préparé directement dans la cuvette spectrophotométrique (volume total 1000  $\mu$ l), contenait 200  $\mu$ L de substrat (phénol), 120  $\mu$ L de SDS, 620  $\mu$ L de tampon et 60  $\mu$ L de solution enzymatique. Le suivi cinétique a conduit à l'établissement des courbes  $A = f(t)$  caractérisant la cinétique réactionnelle (figure II.11).



**Figure II.11:** Cinétique d'oxydation du phénol

## **II.4.4 Oxydation du méthyle hydroquinone**

### **1/ Test de PH**

L'analyse systématique des paramètres réactionnels a révélé que le pH 8 constitue la condition optimale pour l'activité enzymatique, comme en témoigne l'intensité maximale de la coloration caractéristique des produits formés (figure II.12).

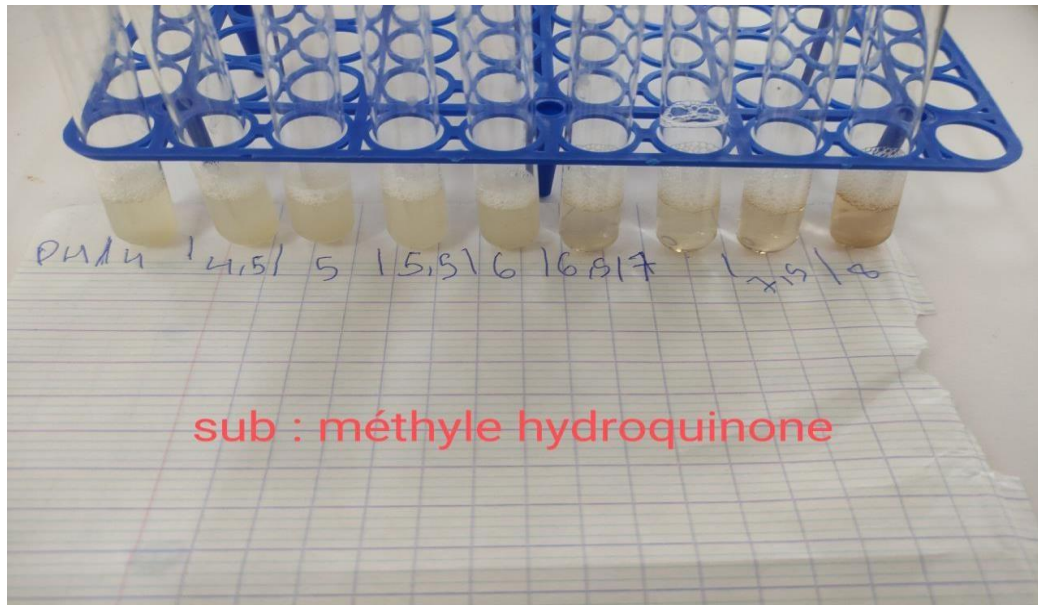


Figure II.12: Influence du PH sur l'oxydation du diphenol méthyle hydroquinone

## 2/ Détermination de la longueur d'onde

La caractérisation spectrophotométrique UV-visible a permis de déterminer que la longueur d'onde d'absorption maximale ( $\lambda_{max}$ ) des produits de réaction se situe à 400 nm (figure II.13).

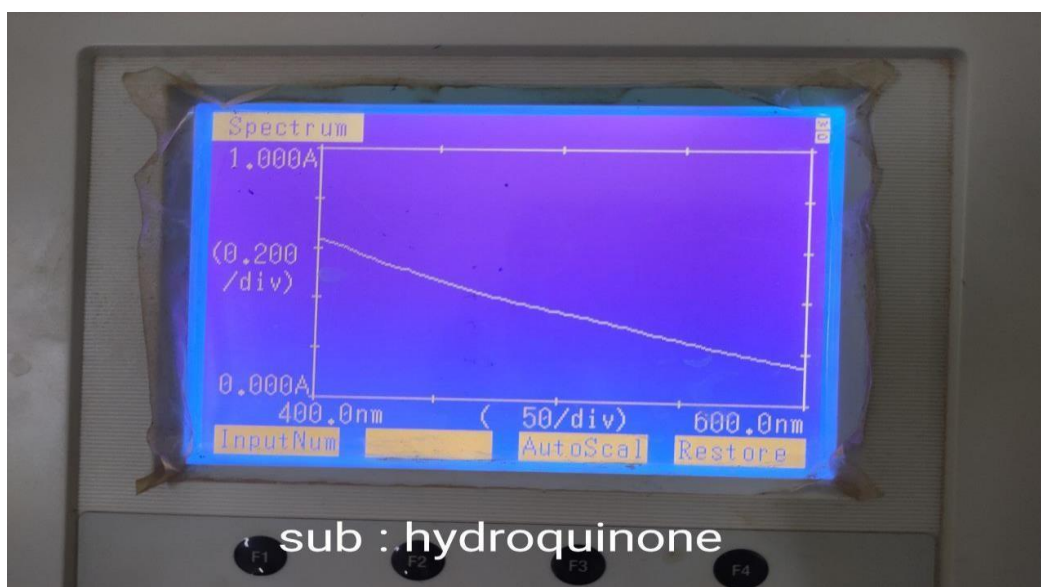
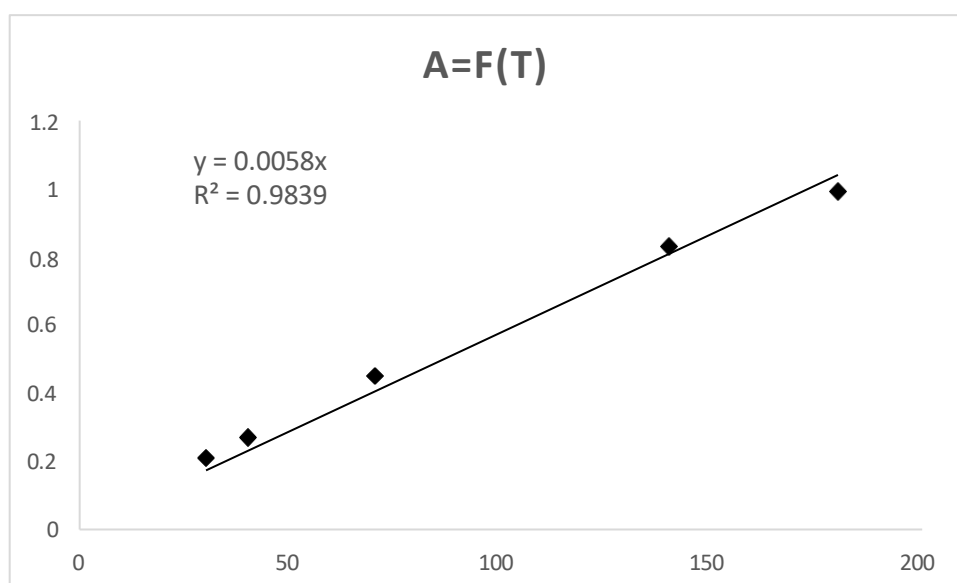


Figure II.13: Spectre d'absorption du méthyle hydroquinone

### 3/ Cinétique réactionnelle avec biocatalyseur : analyse par absorbance

Sur la base de ces paramètres optimisés, une étude cinétique a été menée en suivant l'évolution temporelle de l'absorbance (A) à cette longueur d'onde spécifique. Le mélange réactionnel, préparé directement dans la cuvette spectrophotométrique (volume total 1000  $\mu$ l), contenait 100  $\mu$ L de substrat (méthyle hydroquinone), 80  $\mu$ L de SDS, 780  $\mu$ L de tampon et 40  $\mu$ L de solution enzymatique. Le suivi cinétique a conduit à l'établissement des courbes  $A = f(t)$  caractérisant la cinétique réactionnelle (figure II.14).



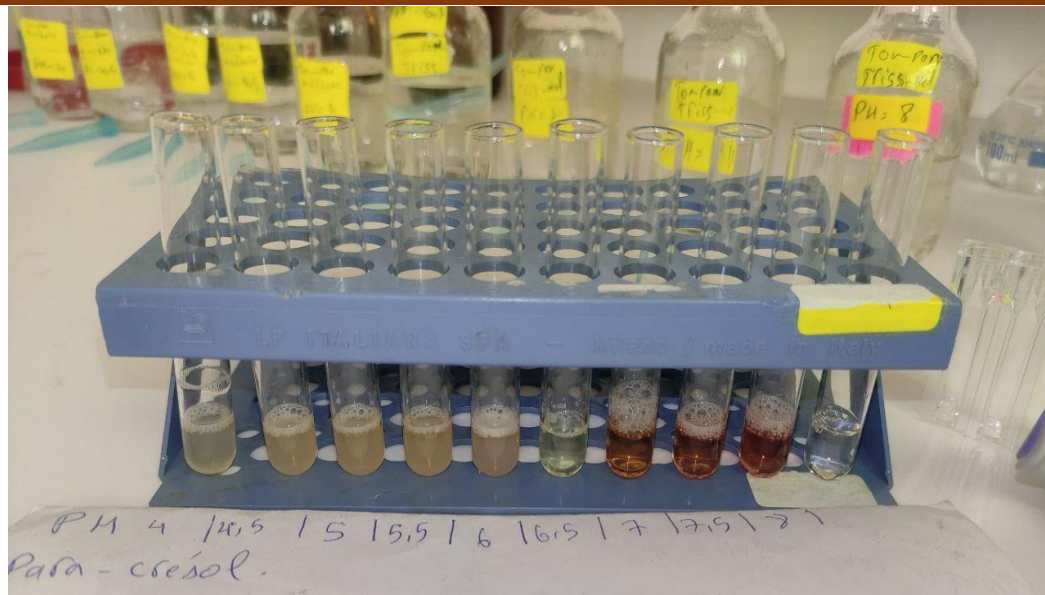
**Figure II.14:** Cinétique d'oxydation du méthyle hydroquinone

#### II.4.5 Oxydation du para crésol

##### 1/ Test de PH

L'analyse systématique des paramètres réactionnels a révélé que le pH 8 constitue la condition optimale pour l'activité enzymatique, comme en témoigne l'intensité maximale de la coloration caractéristique des produits formés.

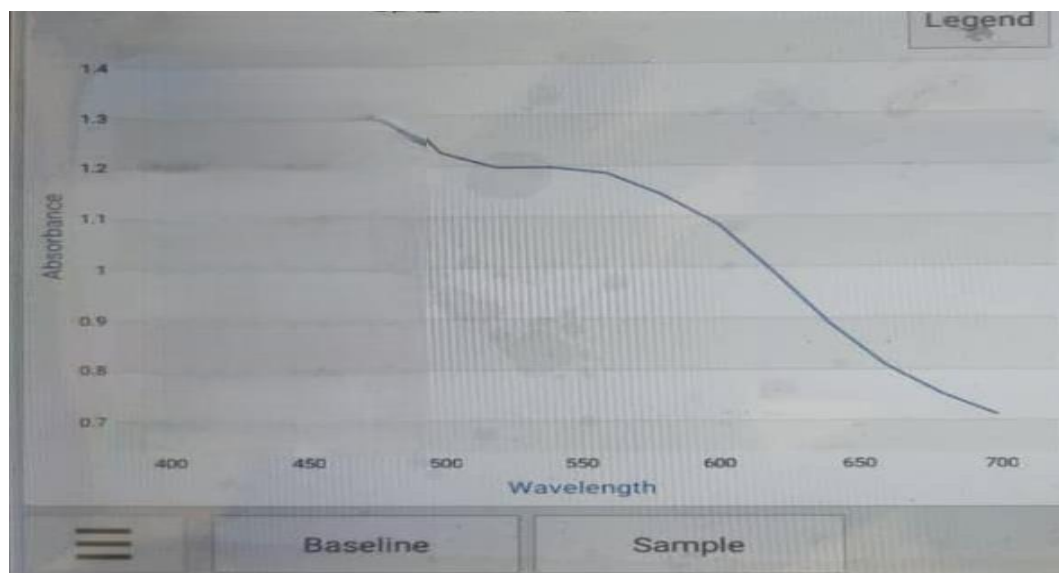
## Chapitre II : Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers



**Figure II.15:** Influence du PH sur l'oxydation du para-crésol

### 2/ Détermination de la longueur d'onde

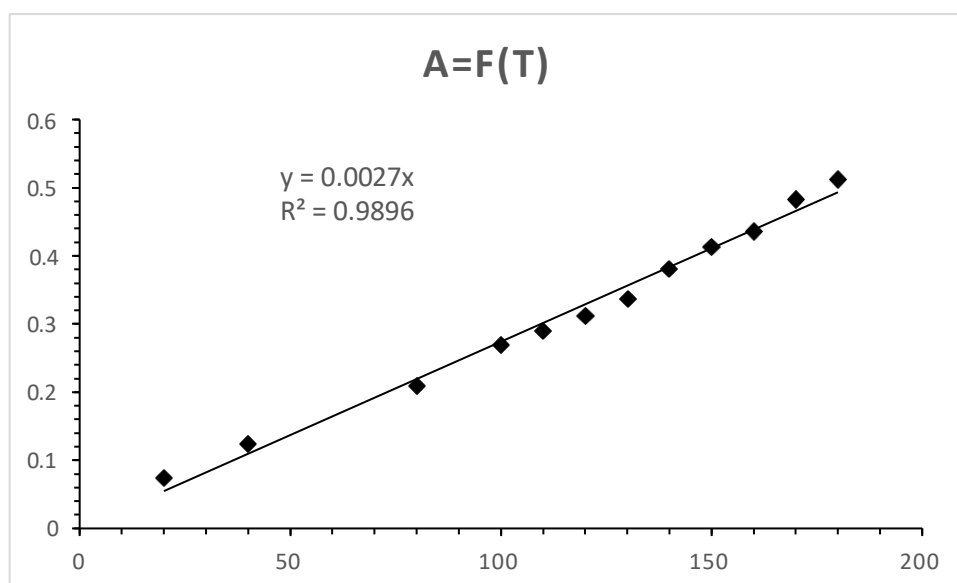
La caractérisation spectrophotométrique UV-visible a permis de déterminer que la longueur d'onde d'absorption maximale ( $\lambda_{max}$ ) des produits de réaction se situe à 500 nm.



**Figure II.16:** Spectre d'absorption d'oxydation du para-crésol

### 3/ Cinétique réactionnelle avec biocatalyseur : analyse par absorbance

Sur la base de ces paramètres optimisés, une étude cinétique a été menée en suivant l'évolution temporelle de l'absorbance (A) à cette longueur d'onde spécifique. Le mélange réactionnel, préparé directement dans la cuvette spectrophotométrique (volume total 1000  $\mu\text{l}$ ), contenait 200  $\mu\text{L}$  de substrat (méthyle hydroquinone), 80  $\mu\text{L}$  de SDS, 680  $\mu\text{L}$  de tampon et 40  $\mu\text{L}$  de solution enzymatique. Le suivi cinétique a conduit à l'établissement des courbes  $A = f(t)$  caractérisant la cinétique réactionnelle



**Figure II.17:** Cinétique d'oxydation du para-crésol

#### II.4.6 Calcul d'activité enzymatique

Le tableau II.2 présente les données cinétiques d'un biocatalyseur agissant sur différents substrats phénoliques.

## Chapitre II : Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers

**Tableau II.2:** Activité enzymatique et paramètres cinétiques de l'oxydation de différents substrats phénoliques.

Substrat	Produit formé	$\epsilon$ ( $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ )	Activité enzymatique (UI/ml).
Diphénol	ortho-benzoquinone	2200 [4]	5.20
Méthylhydroquinone	Méthylbenzoquinone	2800 [5]	4.07
1-Amino-2-naphtol-4-acide sulfonique	1,2 naphtoquinone sulfonique	4500 [6]	2.62
Phénol	ortho-benzoquinone	2200 [4]	4.97
Paracrésol	4-méthyl-ortho-benzoquinone	2 200 [7]	2.94

Le résultat montre que le diphénol est le meilleur substrat avec une activité de 5.20, suivi par le phénol (4.97). La méthylhydroquinone montre une activité légèrement inférieure (4.07), tandis que le paracrésol présente une activité moyenne (2.94). Le substrat le moins efficace est le 1- amino-2-naphtol-4-acide sulfonique (2.62). Ces résultats montrent que le biocatalyseur fonction mieux avec des molécules simples comme le diphénol et le phénol, et moins bien avec des substrats modifiés par des groupes chimiques encombrants.

### II.5 Application du biocatalyseur pour la détection du bisphénol dans les tickets de caisse

#### II.5.1 Réaction chimique dans les tickets de caisse thermiques

Les tickets de caisse thermiques utilisent une réaction chimique pour apparaître sans encre classique. Leur couche sensible contient trois composants clés : un colorant leuco (incolore à l'état initial, comme le cristal violet lactone), un révélateur acide (le bisphénol A ou ses substitués BPS/BPF), et un stabilisant. Lorsque la tête d'impression chauffe localement le papier (80-100°C), le bisphénol libère des protons ( $H^+$ ) qui réagissent avec le colorant leuco,

## Chapitre II : Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers

---

transformant sa structure moléculaire et révélant sa forme colorée (noir ou bleu). Cette réaction instantanée est de type acide-base, où le BPA joue le rôle de donneur de protons.

Problème : ces bisphénols, perturbateurs endocriniens, migrent vers la peau au contact. Depuis 2020, l'UE interdit le BPA dans les tickets, mais ses substituts (BPS, BPF) posent des risques similaires.

Certaines alternatives sans bisphénols émergent, utilisant d'autres composés leuco ou des encres moins réactives.



**Figure II.18:** Reçus de caisse

### II.5.2 Approche méthodologique

L'objectif de cette partie est de développer une méthode de détection du bisphénol dans les supports thermosensibles. Le protocole expérimental a comporté plusieurs étapes clés :

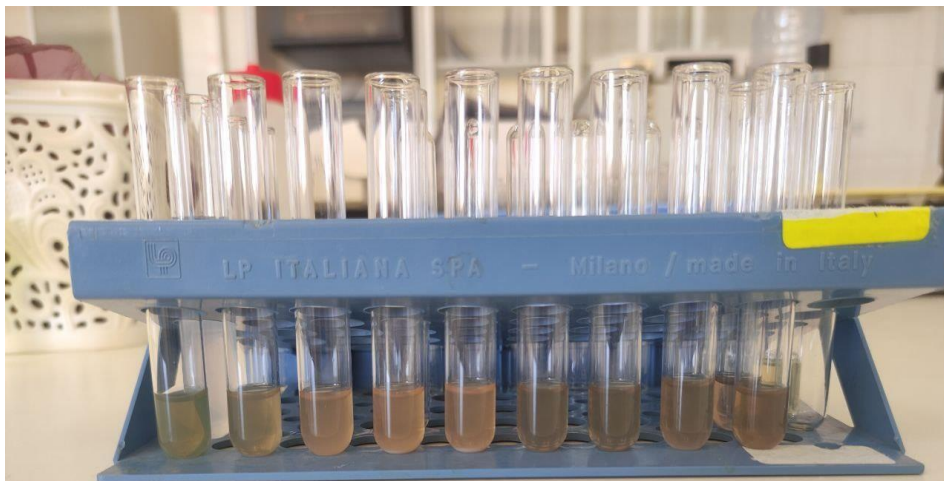
#### 1. Préparation des échantillons :

- Découpage des tickets en fragments de 2x2 mm pour augmenter la surface de contact
- Extraction par macération pendant 24h dans l'eau distillée
- Filtration sur papier Whatman
- Centrifugation à 4000 tr/min pendant 15 minutes

Le surnageant représente l'échantillon à analyser

## **2. Analyse enzymatique**

- Incubation du surnageant avec:
  - Tyrosinase (50 $\mu$ L)
  - SDS 0.1%
  - Tampons à pH 4.0 à 8.0
  - Suivi spectrophotométrique à 440 nm
  - Durée d'incubation : 4 heures à 25°C



**Figure II.19:** Influence du PH sur l'oxydation du bisphénol

## **3. Résultats et interprétation**

L'analyse a révélé une évolution chromatique non spécifique, caractérisée par :

- Une cinétique lente ce qui suggère une réaction non enzymatique
- Changement de coloration en fonction de milieu PH

### **II.5.3 Ces observations suggèrent fortement :**

1. L'absence de bisphénol à concentration détectable
2. La présence de réaction non-enzymatique

## **Chapitre II : Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers**

### **3. Absence de réactivité enzymatique**

# **Conclusion Générale**

## Conclusion Générale

---

Ce mémoire a permis d'extraire et de caractériser la tyrosinase à partir d'épluchures végétales, confirmant son activité enzymatique en tant que biocatalyseur efficace pour l'oxydation de divers composés phénoliques. Le rendement d'extraction, bien que modeste (0,19 %), se situe dans la fourchette des valeurs rapportées pour des sources similaires (0,1–0,5 % pour les épluchures de banane ou de pomme de terre). Cette performance, bien qu'optimisable, valide l'approche de valorisation des déchets agricoles comme source durable d'enzymes.

Les tests d'activité ont révélé une efficacité variable selon les substrats, avec une oxydation plus marquée pour les molécules simples comme le diphénol et le phénol, tandis que les composés plus complexes (dérivés naphtholiques) réagissaient moins rapidement. Les analyses spectrophotométriques (UV-Vis) ont confirmé la formation des produits d'oxydation (quinones) et identifié un pH optimal entre 7 et 8, en accord avec les propriétés connues de la tyrosinase. Ces résultats soulignent le potentiel de cette enzyme pour des applications en bioremédiation, notamment dans le traitement des eaux contaminées par des phénols toxiques.

L'application pratique visant la détection du bisphénol A (BPA) dans les tickets de caisse n'a pas permis d'obtenir les résultats souhaités, probablement en raison d'une concentration trop faible du polluant ou de conditions expérimentales à affiner. Cette limite ouvre des pistes d'amélioration, comme l'optimisation des protocoles d'extraction du BPA ou l'ajustement des paramètres réactionnels.

En perspective, ce travail encourage :

L'optimisation des procédés : Améliorer le rendement d'extraction par des prétraitements des épluchures ou des étapes de purification supplémentaires.

L'élargissement des applications : Tester l'enzyme sur d'autres polluants industriels (pesticides, hydrocarbures) et explorer des méthodes comme l'immobilisation enzymatique pour renforcer sa stabilité.

La détection ciblée : Affiner les protocoles pour quantifier le BPA dans divers supports commerciaux, en vue de solutions de dégradation adaptées.

Cette étude démontre l'intérêt écologique et économique de la tyrosinase végétale comme outil de dépollution, tout en soulignant la nécessité de recherches complémentaires pour en maximiser l'efficacité opérationnelle. Elle s'inscrit dans une démarche d'économie circulaire, où les déchets agricoles deviennent des ressources pour des technologies vertes

# **Références bibliographiques**

## Références de partie expérimentale

---

- [1] Yang, C.P. et al. (2001). "Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel." *Journal of Food Biochemistry*, 25(6), 493–507.
- [2] Gandía-Herrero, F. et al. (2005). "Betaxanthins as substrates for tyrosinase: An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains." *Phytochemistry*, 66(4), 421–432.
- [3] Pierpoint, W. S. (1969). "The reaction of o-quinones with amino acids". *Biochemical Journal*, 112(5), 609–616
- [4] Patai, S. (Ed.). (1974). *The Chemistry of the Quinonoid Compounds* (Vol. 1). Wiley
- [5] Hamasaki, T., et al. (1993). "Spectrophotometric determination of amines with NQS". *Analytical Chemistry*, 65(14), 1909–1914.
- [6] Fukuzumi, S., & Ohkubo, K. (2000). "Electron-transfer properties of ortho-quinones". *Journal of Physical Chemistry B*, 104(47), 11182–11188
- [7] <https://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/lowry.html>

## عنوان المذكرة: استخراج، توصيف، وتطبيق محفز حيوي في أكسدة الفينولات البترولية

المؤطر: بن دهبان سمية

الإسم: حسام الدين - حمزة

اللقب: غربي - مولاي

ملخص: تهدف هذه الدراسة إلى استخراج إنزيم التيروسيناز من قشور الخضروات واستخدامه كمحفز حيوي لأكسدة مركبات الفينول الناتجة عن الصناعة البترولية. شملت التجارب استخلاص الإنزيم وتوصيفه كيميائياً وتطبيقه على خمسة ركائز نموذجية: ثنائي الفينول، حمض 1-أمينو-2-نفتول-4-سلفونيك، ميثيل هيدروكينون، فينول، وبارا-كريزول. أظهرت النتائج نشاطاً إنزيمياً ملحوظاً، مع تفاوت حسب درجة الحموضة وبنية الركيزة. كان ثنائي الفينول الأكثر تفاعلاً (5.20 وحدة/مل)، بينما سجل حمض 1-أمينو-2-نفتول-4-سلفونيك أقل تفاعل (2.62 وحدة/مل). وفيما يخص تطبيق الإنزيم للكشف عن ثنائي الفينول أ (BPA) فقد أظهر غيابه في الأوراق الحرارية.

**كلمات مفتاحية:** تيروزيناز، المحفز الحيوي، الأكسدة، الفينولات البترولية، مكافحة التلوث، الايصالات الحرارية .

**Memory title :** Extraction, Characterization, and Application of a Biocatalyst in the Oxidation of Petroleum Phenols

**Name:** GHERBI – MOULAI **First name:** Hossam Eddine - Hamza **Directed by:** BENDAUGUANE Soumia

**Abstract** This research focuses on the extraction and application of tyrosinase as a biocatalyst for oxidizing phenolic compounds from the petroleum industry. The study involved extracting tyrosinase from vegetable peels, followed by chemical characterization and its use in oxidizing five model substrates: diphenol, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, methylhydroquinone, phenol, and para-cresol. Results demonstrated significant enzymatic activity, with variations depending on pH and substrate structure. Diphenol was the most reactive substrate (5.20 U/ml), while 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid showed the lowest reactivity (2.62 U/ml). An attempt to detect bisphenol A (BPA) in thermal receipts shows its absence.

**Key words:** Tyrosinase, biocatalyst, oxidation, petroleum phenols, bioremediation, thermal receipts.

**Titre du mémoire :** Extraction, caractérisation et application d'un biocatalyseur dans l'oxydation des phénols pétroliers

**Nom :** GHERBI - MOULAI **Prénom :** Hossam Eddine - Hamza **Encadreur :** BENDAUGUANE Soumia

**Résumé** Ce mémoire explore l'extraction et l'utilisation de la tyrosinase, une enzyme d'origine végétale, comme biocatalyseur pour l'oxydation de composés phénoliques issus de l'industrie pétrolière. L'étude a porté sur l'extraction de la tyrosinase à partir d'épluchures végétales, suivie de sa caractérisation chimique et de son application dans l'oxydation de cinq substrats modèles : diphéno, 1-amino-2-naphtol-4-acide sulfonique, méthylhydroquinone, phénol et para-crésol. Les résultats ont montré une activité enzymatique significative, avec des variations en fonction du pH et de la structure des substrats. Le diphéno a été identifié comme le substrat le plus réactif (5,20 UI/ml), tandis que le 1-amino-2-naphtol-4-acide sulfonique a présenté la réactivité la plus faible (2,62 UI/ml). Une tentative de détection du bisphénol A (BPA) dans les tickets de caisse a montré son absence .

**Mots clés :** Tyrosinase, biocatalyseur, oxydation, phénols pétroliers, dépollution, tickets de caisse.

*Le résumé doit être rédigé en deux langues différentes au moins*