

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
Université Abderahmane MIRA – Béjaïa



Faculté des Sciences de la Nature et de la vie  
Département de Microbiologie

**Mémoire de fin de cycle**  
**En vue de l'obtention du diplôme de Master**  
En  
**Microbiologie**

Option  
**Biotechnologie Microbienne**

**THEME**

---

*Dégommage d'une huile de soja par la  
phospholipase A<sub>1</sub> immobilisée sur une bentonite*

---

**Présenté par :**

*Melle* BRAHAMI Radia & *Melle* CHANTOUFI Tafath

**Devant le jury composé de :**

<b>ARKOUB O.</b>	<b>M. A. A</b>	<b>Présidente</b>	<b>U. A/Mira Béjaïa.</b>
<b>BOUCHERBA N.</b>	<b>M. C. B</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>U. A/Mira Béjaïa.</b>
<b>SOUAGUI S.</b>	<b>M. A. B</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>U. A/Mira Béjaïa.</b>
<b>BOUKERROUI A.</b>	<b>M. C. A</b>	<b>Encadreur</b>	<b>U. A/Mira Béjaïa.</b>

*Promotion : Juin 2013*

## Remerciements

Nous tenons à remercier le Dieu de nous avoir donné le courage pour mener à terme ce modeste travail.

Nos remerciements s'étendent également à notre promoteur Mr. BOUKERROUI A-H, qui nous a constamment guidée et encouragée. Nous ne le remercierons jamais assez pour sa disponibilité et pour avoir mis à notre disposition toute sa compétence et sa connaissance scientifique. Qu'il trouve ici l'expression de nos vifs remerciements.

Nos remerciements s'adressent aussi aux membres de jury qui ont accepté sans réserve, de juger et d'évaluer ce travail. Qu'ils soient assurés de nos profondes reconnaissances.

Nous tenons à remercier aussi les ingénieurs de la raffinerie des huiles du complexe CEVITAL spa, pour leurs collaborations et conseils durant notre stage pratique.

Enfin, nous remercions particulièrement nos parents, pour leurs soutiens inconditionnels tout au long de ces longues années d'études.

M<sup>elle</sup> BRAHAMI R. & M<sup>elle</sup>CHANTOUFI T.



# Dédicaces

*Au nom du tout puissant  
J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail*

*A*

*Mes parents qui voient aujourd'hui leurs efforts et leurs sacrifices couronnés par ce rapport.  
Ils ont veillé à mon éducation avec infiniment d'amour et d'affection. Que Dieu me  
permette de leur rendre au moins une partie, aussi infime soit-elle, de tout ce que je leur dois.*

*Mes deux chère sœurs Amel et Cylia et mon unique frère Reda en témoignage des liens  
fraternels solides qui nous unissent. Aucune dédicace ne saurait leur exprimer mes  
sentiments. Je leurs souhaite une longue vie, beaucoup de bonheur et de réussite.*

*A mon âme sœur et ma moitié Nadjim merci pour toute ton aide.*

**RADIA**





# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail*

*A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation : A la mémoire de ma très chère mère « salîha » que dieu ait son âme et l'accueille dans son vaste paradis.*

*Ceux que j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et je suis très fière de les avoir et tout les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur porte ; mes très chers parents pour leurs sacrifices, leurs aide, leurs conseils et leurs patience que Dieu me les protège.*

*A ma très chère et précieuse grand-mère maternelle « Messaouda » qui m'a toujours soutenue, et à l'intérêt qu'elle a toujours porté pour mes études, sans oublié ma grand-mère paternelle « Khira » que dieu me les protège.*

*A mon très cher et unique frère : Cherrif Amazigh.*

*A mes adorables et très chères sœurs : Thanina, roza, et thellili.*

*A ma grande famille, petits et grands.*

*A mes chers amis : Zineb, Hayat, Amel, Fatima, Baya, Samra, dhrifa, youcef, imad, hani, elhadi, sabah, samira, yacine.*

*Son oublié mes chers amis de l'association ADAC*

*A mes copines de chambre 103: Nora, tassadit, samia, et à mes copines de 105 : louia ; bisa, wissem, aini*

*A tous les amis de l'université et aux résidents de la cité universitaire Amriw.*

*Et enfin à celle avec qui j'ai partagé ce modeste travail, chère Radia.*

**TAFATH**



## *Liste des abréviations*

**AGL** : Acide Gras Libre

**AP** : Acide Phosphatidique

**BSA** : Sérum Albumine Bovin

**DAG** : Diacyl-Glycérol

**PC** : Phosphatidyl-Choline

**PE** : Phosphatidyl-Ethanolamine

**PI** : Phosphatidyl-Inositol

**PH** : Phosphatide Hydratable

**PNH** : Phosphatide Non Hydratable

**ppm** : Partie Par Million

**PLA<sub>1</sub>** : Phospholipase A<sub>1</sub>

**PVA** : Alcool Polyvinylique

**TAG** : Triacyl-Glycérides

# *Liste de tableaux*

1	Comparaison des méthodes d'immobilisation .....	P: 11
2	Propriétés de la Lecitase <sup>®</sup> Ultra (Novozymes A/S, 2007) .....	P : 12
3	Préparation des solutions tampon d'acide citrique à différents pH.....	P : 13

# Table de figure

1	Les principales étapes de raffinage des huiles alimentaires .....	4
2	Les phospholipases d'intérêt pour le traitement des huiles végétales .....	6
3	Les propriétés de l'enzyme et du support déterminent les propriétés de l'enzyme immobilisée.....	8
4	Méthodes d'immobilisation des enzymes .....	10
5	Evolution de l'activité lipasique en fonction de la concentration en protéine de la solution enzymatique (Solution tampon d'acide citrique, pH 5.5; température 40 °C) .....	17
6	Evolution de l'activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> libre en fonction de la durée d'incubation (Solution tampon d'acide citrique; pH = 5.5, Température = 40 °C) .....	18
7	Evolution de l'activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> en fonction du pH ([Protéine] = 18 mg/ml; température 40 °C) .....	19
8	Evolution de l'activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> en fonction de la température (pH 5.5; 18 mg/ml concentration en protéine de la solution enzymatique).....	20
9	Evolution de la durée d'incubation sur l'activité phospholipasique (pH 5.5 ; T 40 °C).....	21
10	Evolution de l'activité phospholipasique en fonction de la concentration en protéine de la solution enzymatique (pH 5.5; T 40 °C).....	22
11	Evolution de l'activité phospholipasique en fonction en fonction du Ph ([Protéine] : 18 mg/ml; T 40 40 °C) .....	22
12	Evolution de l'activité phospholipasique en fonction en fonction de la température (pH 5.5; [Protéine] : 18 mg/ml) .....	23
13	Evolution de l'activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> immobilisée en fonction de la concentration en protéine (pH 7; T : 55 °C) .....	24
14	Evolution de l'activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> immobilisée en fonction de la durée d'incubation (pH 7; [Protéine] : 10 mg/ml) .....	25
15	Evolution de l'activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> immobilisée en fonction de la température (pH 7; [Protéine] : 10 mg/ml) .....	26
16	Evolution de l'activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> immobilisée en fonction du pH ([Protéine] : 10 mg/ml, T 55 °C).....	27
17	Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA <sub>1</sub> immobilisée en fonction de la durée d'incubation (pH 7; T : 55 °C) .....	28
18	Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA <sub>1</sub> immobilisée en fonction de la concentration en protéine (pH 7; T : 55 °C; [Protéine] : 10 mg/ml).....	29
19	Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA <sub>1</sub> immobilisée en fonction	

	du pH (T : 55 °C); [Protéine] : 10 mg/ml) .....	30
20	Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA <sub>1</sub> immobilisée en fonction de la température (pH 7; [Protéine] : 10 mg/ml) .....	31
21	Comparaison entre l'activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction de la température (pH 7) .....	31
22	Comparaison entre l'activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction du pH (T : 55).....	32
23	Comparaison entre l'activité phospholipasique de la PLA <sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction du PH .....	33
24	Comparaison entre l'activité phospholipasique de la PLA <sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction de la température.....	34
25	Evolution de l'activité PLA <sub>1</sub> immobilisée en fonction du nombre de cycle d'utilisation .....	35
26	Hydrolyse des phospholipides par la PLA <sub>1</sub> immobilisée et libre (Conditions des essais : T 55 °C, pH 5.5) .....	36



# Table de matières

Introduction générale .....	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
I.1 Introduction .....	3
I.2 Elimination des phospholipides par procédé de dégommege .....	3
I.3 Dégommege enzymatique des huiles alimentaires .....	4
I.4 Les phospholipides dans le dégommege des huiles .....	5
I.3.1 La Lecitase Ultra .....	5
I.4 Immobilisation des enzymes : motivations .....	6
I.4.1 Propriétés des enzymes immobilisée.....	8
I.4.2 Le support .....	8
I.4.3 Méthodes d'immobilisation .....	9
I.4.4 Immobilisation par adsorption .....	11
I.5 Utilisation des minéraux d'argile comme support d'immobilisation des enzymes	11
I.5.1 Immobilisation des enzymes sur la bentonite .....	11
<b>Chapitre II : Matériels et méthodes</b>	
II.1 Matériel .....	12
II.1.1 Enzyme .....	12
II.1.2 Support pour l'immobilisation .....	12
II.1.3 Autres produits et réactifs chimiques utilisés.....	12
II.2 Matériels .....	13
II.2.1 Sélection de tampon et préparation.....	13
II.2.2 Méthodes expérimentales utilisée pour l'immobilisation de la PLA <sub>1</sub> .....	13
II.2.3 Méthodes analytiques .....	14
II.2.3.1 Dosage des protéines.....	14
II.2.3.2 Dosage de phosphore.....	14
II.2.4 Détermination de l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme.....	14
II.2.4.1 Activité lipasique.....	14
II.2.4.2 Activité phospholipasique .....	15
II.2.4.3 Effet de la durée d'incubation.....	15
II.2.4.4 Effet de la concentration en protéine de la solution enzymatique .....	15

II.2.4.5 Optimums du pH et de la température .....	15
II.2.5 Essai de réutilisation de la PLA <sub>1</sub> immobilisée .....	16
II.2.6 Essai de dégomme enzymatique de l'huile de soja .....	16

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

III.1 Activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> libre .....	17
III.1.1 Influence de la concentration de la solution enzymatique .....	17
III.1.2 Influence de la durée d'incubation .....	18
III.1.3 Influence du pH .....	18
III.1.4 Influence de la température .....	19
III.2 Activité phospholipasique de la PLA <sub>1</sub> libre .....	20
III.2.1 Influence de la durée d'incubation .....	20
III.2.2 Influence de la concentration en protéine .....	21
III.2.3 Influence du pH .....	22
III.2.4 Influence de la température .....	23
III.3 Activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> immobilisé .....	24
III.3.1 Influence de la concentration en protéine.....	24
III.3.2 Influence de la durée d'incubation .....	24
III.3.3 Influence de la température .....	25
III.3.3 Influence du pH .....	26
III.4 Activité phospholipasique de la PLA <sub>1</sub> immobilisée .....	27
III.4.1 Influence de la durée d'incubation .....	27
III.4.2 Influence de la concentration en protéine .....	28
III.4.3 Influence du pH .....	29
III.4.4 Influence de la température .....	30
III.5 Comparaison entre l'activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction de la température .....	31
III.6 Comparaison entre l'activité lipasique de la PLA <sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction du pH .....	32
III.7 Comparaison entre l'activité phospholipasique de la PLA <sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction du pH.....	33
III.8 Comparaison entre l'activité phospholipasique de la PLA <sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction de la température.....	34
III.9 Réutilisation de la PLA <sub>1</sub> immobilisée .....	35

III.10 Dégommage de l'huile de soja avec la PLA <sub>1</sub> libre et immobilisée.....	36
<b>Conclusion</b> .....	37

## **Bibliographie**

## **Annexe**

## Résumé

# Synthèse bibliographique

## I.1 Introduction

Les procédés de raffinage des huiles alimentaires ont pour objectifs principales de retirer les impuretés (acides gras libres, matières en suspension, cire, pigments, traces de pesticides et d'oligo-métaux, etc) qui nuisent à la qualité de l'huile (goût, odeur, apparence, stabilité) sans pour autant altérer les triglycérides et avec une perte aussi minime que possible.

A cet effet, deux méthodes; chimiques et physiques (Fig. 1) ont été développées afin d'éliminer ces impuretés présentes dans l'huile brute. Le procédé chimique qui reste le plus utilisé génère des effluents polluants. La législation environnementale de plus en plus inflexible en ce qui concerne la réduction des quantités de déchets encourage de plus en plus les unités de raffinage à intégrer dans leur procédé la technologie du raffinage enzymatique (Buchholz et al, 2005).

## I.2 Elimination des phospholipides par le procédé de dégomme

Les phosphatides (couramment connus sous le nom de lécithine ou gommes), se présentent sous plusieurs formes à savoir les phosphatidylcholine (PC), phosphatidyl-éthanolamine (PE), phosphatidyl-inositol (PI) et l'acide phosphatidique (AP), y compris les formes dégradées de phospholipides (tels que les lyso-phospholipides). L'affinité pour l'eau du groupe d'ester détermine l'affinité globale pour l'eau d'un phospholipide: plus l'affinité de l'eau est élevée, plus la faculté d'émulsification est également élevée (Fig.1). L'affinité relative des phospholipides pour l'eau s'appelle habituellement "l'hydratabilité". Le phosphatidyl-Inositol (PI) et l'acide phosphatidique (AP) sont habituellement considérés comme des phospholipides hydratables (PH) qui sont habituellement éliminés par centrifugation en ajoutant simplement de la vapeur d'eau à l'huile brute. Cette opération s'appelle le dégomme à l'eau. Alors que les sels d'AP et de PE du calcium (Ca), du magnésium (Mg) et du fer (Fe) qui représentent les phospholipides non-hydratés (PNH) sont beaucoup plus difficiles à retirer de l'huile (Dijkstra, 2010).

# Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Les esters d'acides gras libres facilement hydratables et difficilement hydratables dénaturent la qualité de l'huile pendant le stockage de ce dernier. L'hydrolyse de ses esters donne des acides gras libre (AGL) et du glycérol. La neutralisation de ses AGL donne des savons qui seront séparés de l'huile par centrifugation. Le rôle principale de ces traitements est de garantir une teneur faible en phosphore (phospholipides) dans l'huile alimentaire (Yang et al, 2006).

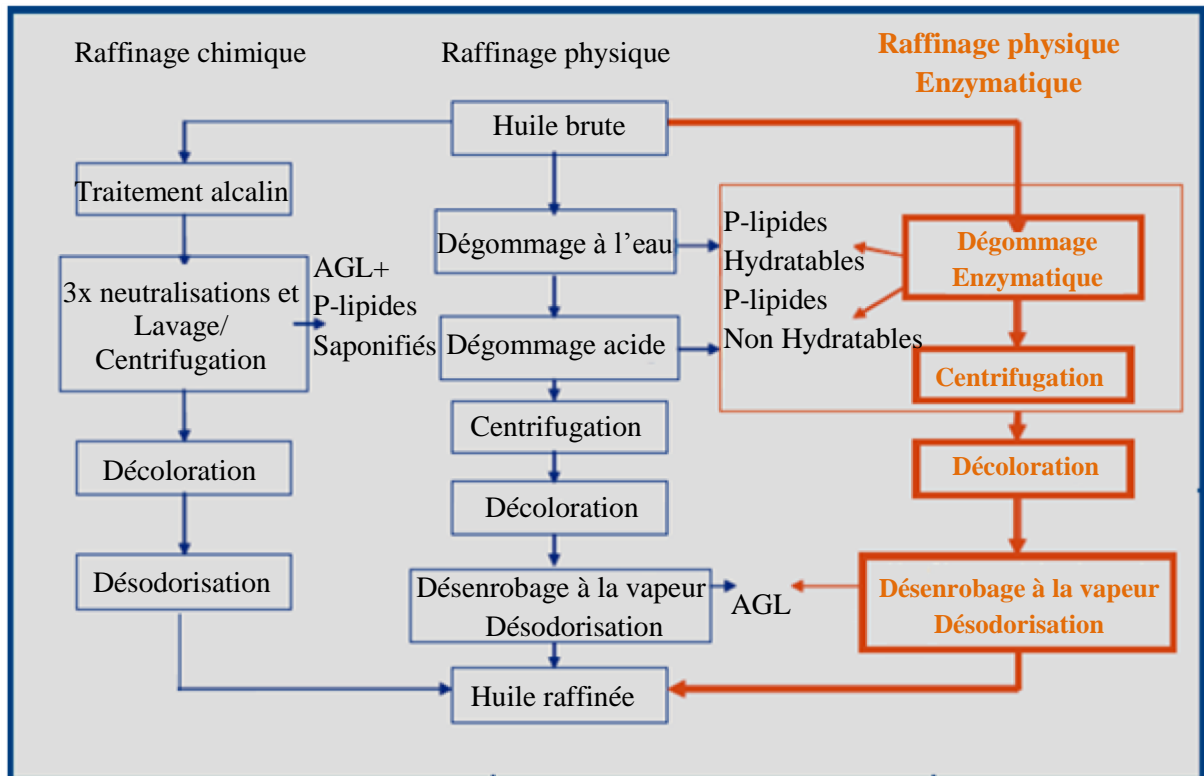


Figure 1. Les principales étapes de raffinage des huiles alimentaires (Nielsen et Cowan, 2003).

## I.3 Dégommage enzymatique des huiles alimentaires

Le procédé de dégommage enzymatique des huiles est une forme du raffinage physique dans laquelle une phospholipase est employée pour convertir les phosphatides non hydratables en leurs formes hydratables, leur permettant ensuite d'être enlevés par centrifugation après la neutralisation (savon). Indépendamment de la réduction de la quantité des réactifs chimiques, de l'eau utilisée pendant le procédé de raffinage, une amélioration dans le rendement et une réduction des frais d'exploitation, (Yang et al, 2006), le procédé comprend d'autres avantages à savoir :

1. Les réactions enzymatiques sont habituellement réalisées dans des conditions modérées.

2. Les enzymes sont hautement spécifiques.
3. Les quantités d'enzyme exigées sont minimales.
4. Des huiles avec une faible teneur en phosphore sont obtenues à la fin de la réaction.

Le procédé enzymatique se déroule en trois étapes importantes, ici, seulement le concept de base est récapitulé : (1) ajustement des conditions optimales pour la réaction enzymatique; pH et température (2) ajout de l'enzyme, (3) séparation de la boue de l'huile.

A la fin du procédé, la teneur en phosphore est inférieure à 10 ppm (Yang et al, 2006 et Yang et al, 2008).

### **I.4 Les phospholipases dans le dégommage des huiles**

Les enzymes représentent une méthode efficace pour convertir les phospholipases non hydratables en leur forme hydratable. Ce sont des catalyseurs naturels et sélectifs, qui réagissent dans des conditions, de température et de pH modérés. Les enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse des phospholipides sont dites les phospholipases.

Plusieurs types de phospholipases d'intérêt pour le traitement des huiles végétales sont rapportés dans la littérature scientifique (Fig. 2) (Galhardo et Dayton, 2012). Ces enzymes sont capables d'éliminer les acides gras des phospholipides. Selon la position de l'acide gras éliminé, la Phospholipase A (PLA<sub>1</sub> et 2) est capable d'éliminer un acide gras au niveau de la position Sn-1 et Sn-2 respectivement et libère un lyso-phospholipide. La phospholipase C (PLC ou la Purifine<sup>®</sup>) élimine le groupement phosphoro-ester et produit un diglycéride (DAG). Alors que la phospholipase D (PLD) est présente dans les graines et est responsable de la destruction de PC et de la formation de l'AP pendant le stockage et le traitement. Selon Yang et al. (2006), deux types de phospholipase peuvent être utilisés dans le procédé de dégommage des huiles à savoir la Lecitase<sup>®</sup>10L (phospholipase A<sub>2</sub> pancréatique) et la Lecitase<sup>®</sup>Novo (lipase microbienne) (Mishra et al, 2009).

#### **I.4.1 La Lecitase<sup>®</sup> Ultra**

La Lecitase<sup>®</sup>Ultra est une nouvelle lipase d'origine microbienne (*thermomyces lanuginosus/fusarium oxysporum*) développée par Novozymes (Nielsen et Cowan, 2003). Elle a une activité inhérente envers les phospholipides (PC, PI, PE et AP) et les TAGs. Les opérateurs utilisent cette enzyme à pH acide (4.5 - 5.5). Ce qui requiert l'utilisation des équipements en acier inoxydable. L'huile dégommée avec la Lecitase<sup>®</sup>Ultra est de bonne

# Chapitre I : Synthèse Bibliographique

qualité. Elle a souvent une faible teneur en phosphore (<10 ppm, couramment <5 ppm) avec une légère augmentation de la teneur en acide gras libre. Ainsi, une huile avec une teneur en phosphore de 2 % engendrera une augmentation en AGL de 0.38 %. D'autre part il est important de noter que les pertes en huiles durant le procédé de dégomme n'est pas proportionnelle avec la teneur en phosphore de l'huile brute. En effet, l'utilisation des enzymes permet de réduire la teneur en phosphore par la réduction de leurs propriétés d'émulsifiasson est de ce faite un gain dans le rendement est enregistrée.

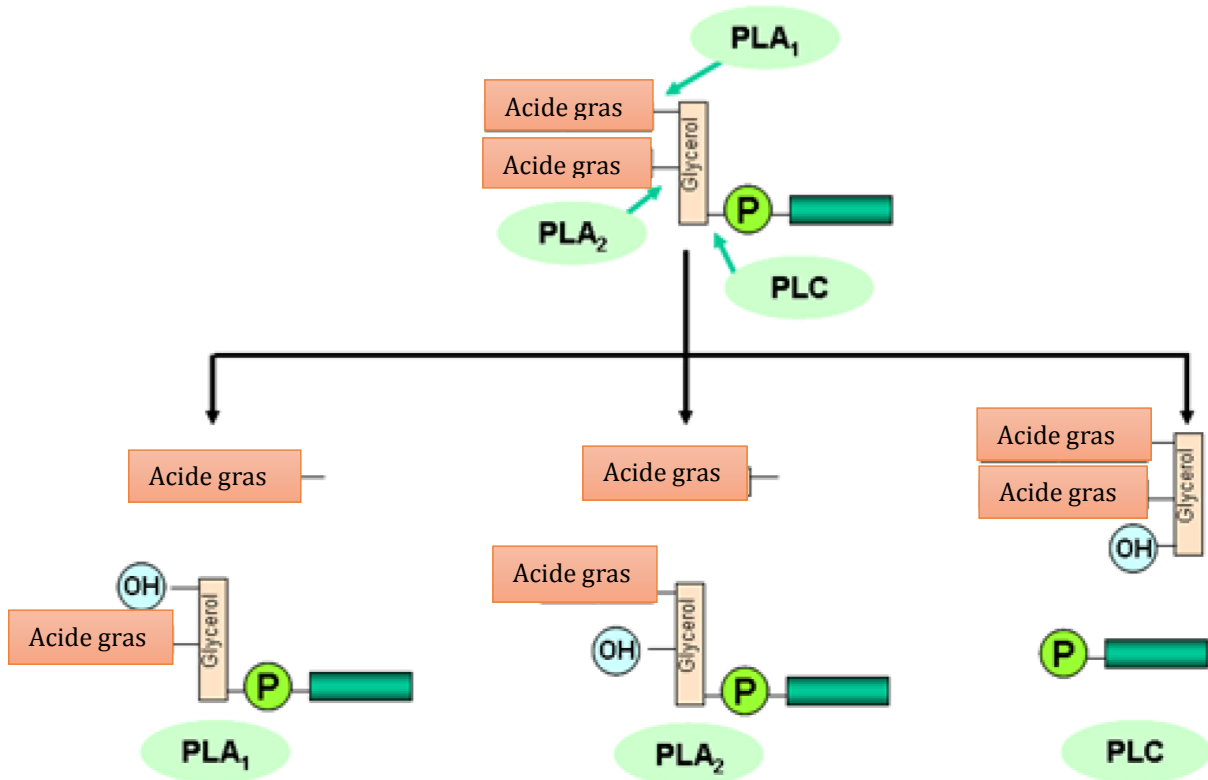


Figure 2 – Les phospholipases d'intérêt pour le traitement des huiles végétales (Galhardo et Dayton, 2012).

## I.5 Immobilisation des enzymes : motivations

Les progrès enregistrés dans le domaine du génie génétique peut permettre à l'industrie de s'offrir des enzymes avec des propriétés améliorées et aux coûts réduits. L'usage encore plus économique des enzymes dans l'industrie exige leur immobilisation, qui permettra leurs réutilisations et facilitera la mise en ouvres des procédés en continu. Les enzymes immobilisées sont définies par Katchalski-Katzir (2000), comme confinement ou localisation des enzymes dans une certaine région définie de l'espace avec rétention de leurs activités catalytiques, qui peuvent être employé à plusieurs reprises et continûment.



## Chapitre I : Synthèse Bibliographique

---

Le concept de l'immobilisation des enzymes a fait l'objet de recherche pendant plus de 30 années et par conséquent, plusieurs méthodologies et une vaste gamme d'applications ont été proposées. Nelson et Griffon ont réalisé la première recherche sur l'immobilisation en 1916. Dans leur travail, une Invertase a été adsorbée sur le charbon de bois et l'hydroxyde d'aluminium (Pitcher, 1980). Entre-temps, la première étude d'immobilisation de lipase a été effectuée en 1956 par Brandenberger sur une résine. Cependant, les premiers essais pour l'usage de la lipase immobilisée dans des réactions de synthèse ou d'hydrolyse d'esters ont été réalisés par Iwai et *al.* en 1964.

La première application industrielle des enzymes immobilisées a été rapportée par Tosa et *coll.* En 1967 qui ont développés une colonne pour l'immobilisation d'une Aminoacylase utilisée dans la synthèse des acides aminés optiquement actifs. Dans les années 1970, deux autres systèmes d'enzymes immobilisés ont été testés à l'échelle pilote. Aux Etats-Unis, un glucose isomérase immobilisé a été utilisé pour convertir le glucose en fructose. Ces applications industrielles couronnées de succès ont incité plusieurs chercheurs à se focaliser sur les technologies d'enzymes, menant à une augmentation du nombre de procédés industriels basés sur des réacteurs à enzyme immobilisée (Katchalski-Katzir, 2000).

L'immobilisation des enzymes semble offrir principalement des avantages économiques. Cependant, il y en a d'autres avantages qui sont notées comme ci-dessous.

- Les enzymes peuvent être réutilisées;
- Les procédés peuvent être actionnés continûment et peuvent être promptement contrôlés ;
- Les produits sont facilement séparés;
- Réduction des effluents;
- Dans certains cas, les propriétés de l'enzyme (activité et stabilité) peuvent être favorablement modifiées suite à son immobilisation;
- Aucune contamination suite à l'ajout de l'enzyme;
- Fournit une plus grande pureté de produit avec un rendement élevé.

En dépit de ces avantages, l'application industrielle est encore limitée par :

- Investissement requis pour introduire un nouveau matériel;
- Nature et le coût du support d'immobilisation et le procédé d'immobilisation (y compris les pertes d'activité);

# Chapitre I : Synthèse Bibliographique

- Les performances du système. En effet, plusieurs facteurs peuvent influencer le rendement d'une enzyme immobilisée. Les facteurs les plus importants sont le choix de support et la méthode d'immobilisation (Picher, 1980).

## I.5.1 Propriétés des enzymes immobilisées

Les propriétés des enzymes immobilisées sont déterminées par les propriétés de l'enzyme et du support. Ceci est schématiquement représenté par la Fig. 3

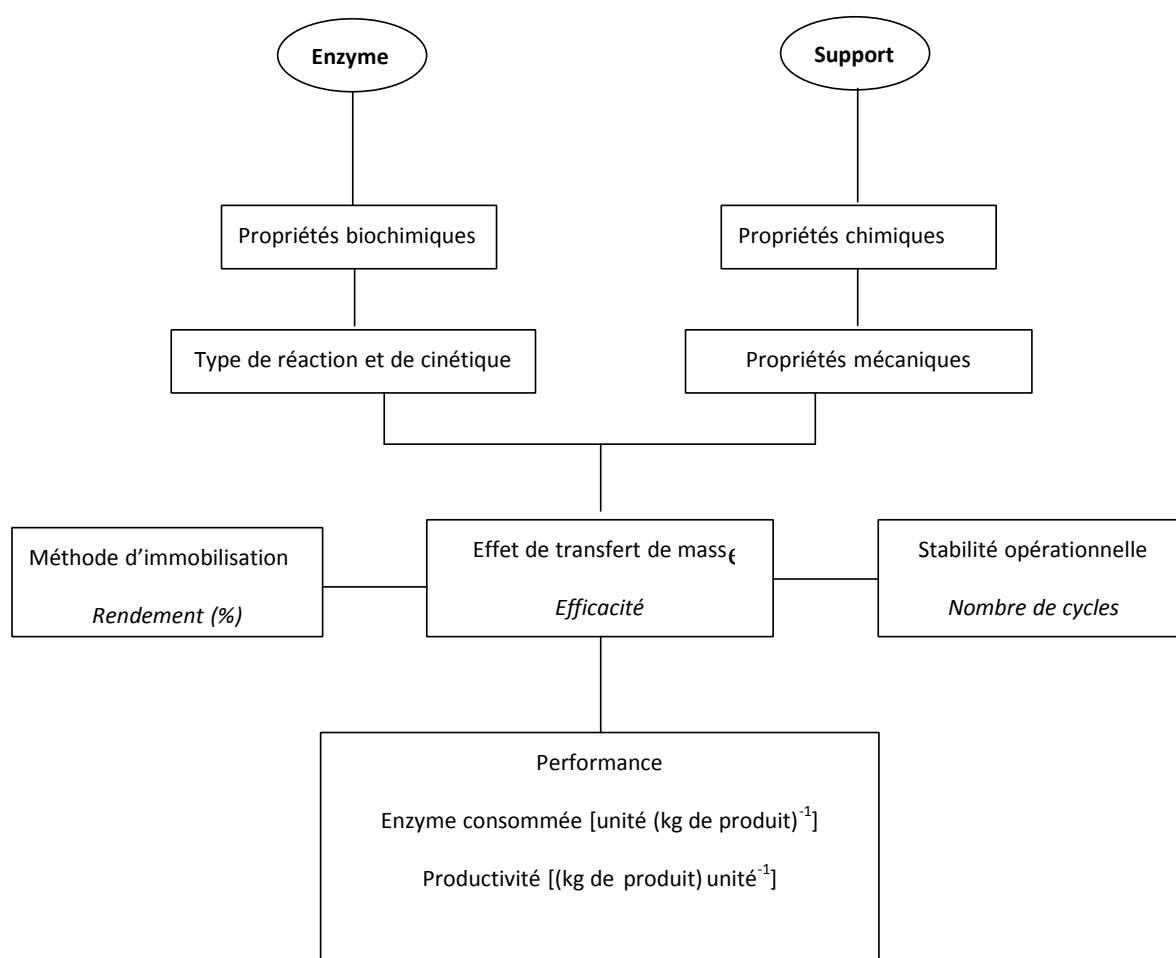


Figure 3 – Les propriétés de l'enzyme et du support déterminent les propriétés de l'enzyme immobilisée (Tischer et Kascher, 1999 & Tischer et Wedekind, 1999).

## I.5.2 Le support

Les propriétés d'une enzyme immobilisée dépendent grandement des propriétés du support et c'est pour cette raison qu'il devrait être choisi avec soin. Les supports souvent utilisés sont classés en trois catégories (Brena et Batista, 2006) :

## Chapitre I : Synthèse Bibliographique

---

- les supports inorganiques;
- les supports organiques de sources naturelles;
- et les supports organiques synthétiques.

Les supports inorganiques sont souvent pourvus d'une stabilité plus grande que les supports organiques. Ceci est dû à une inertie plus élevée aux conditions réactionnelles telles que la pression et la température. D'autre part, l'abrasion peut se produire dans les réacteurs en batch. Les supports inorganiques souvent utilisés sont la silice et ses dérivés, (Luckarift et al, 2004 & Ford et al, 2010), la Celite (Vulfson et al , 2001 & Khar et Nakajima, 2000 & Sheelu et al, 2008) et les supports à base aluminium (Zeng et al, 2009). Ils sont plus attractifs que les autres supports en raison de leur faible coût et possèdent aussi une bonne stabilité thermiques. Par conséquent, ils y ont une immense place dans le domaine de la recherche-développement (Ôzturk et al, 2008). En effet ils ont été considérablement étudiés et des développements ont été mené quant à leur application à l'échelle laboratoire et industrielle. Les supports organiques de sources naturelles, interagissent faiblement avec les enzymes en raison de leur hydrophilicité, menant à une faible inactivation de l'enzyme. Cependant, ceci mène à une faible fixation de l'enzyme sur le support qui doit être régénérée. De plus, la stabilité mécanique de ces matériaux est plutôt faible. L'agarose (Cabreraa et al, 2008 & Rodrgues et al, 2009) les dérivés de cellulose (Mansee et al, 2005) et dextrine (Fernandez et al 2011 & Mansan et Lopez, 1981) sont les supports naturels généralement les plus utilisés. Pour les supports organiques synthétiques, tels que les polymères synthétiques, sont couramment employés comme support d'immobilisation (Bergaya et al, 2006). Le problème majeur lié à ces supports est leurs faible stabilité thermique et aux variations du pH (Ozturk et al, 2008).

### **1.5.3 Les méthodes d'immobilisation**

Les méthodes d'immobilisation des enzymes peuvent être classifiées en trois catégories principales (Fig. 4). Et le tableau 1 donne une comparaison entre les différentes méthodes d'immobilisation.

# Chapitre I : Synthèse Bibliographique

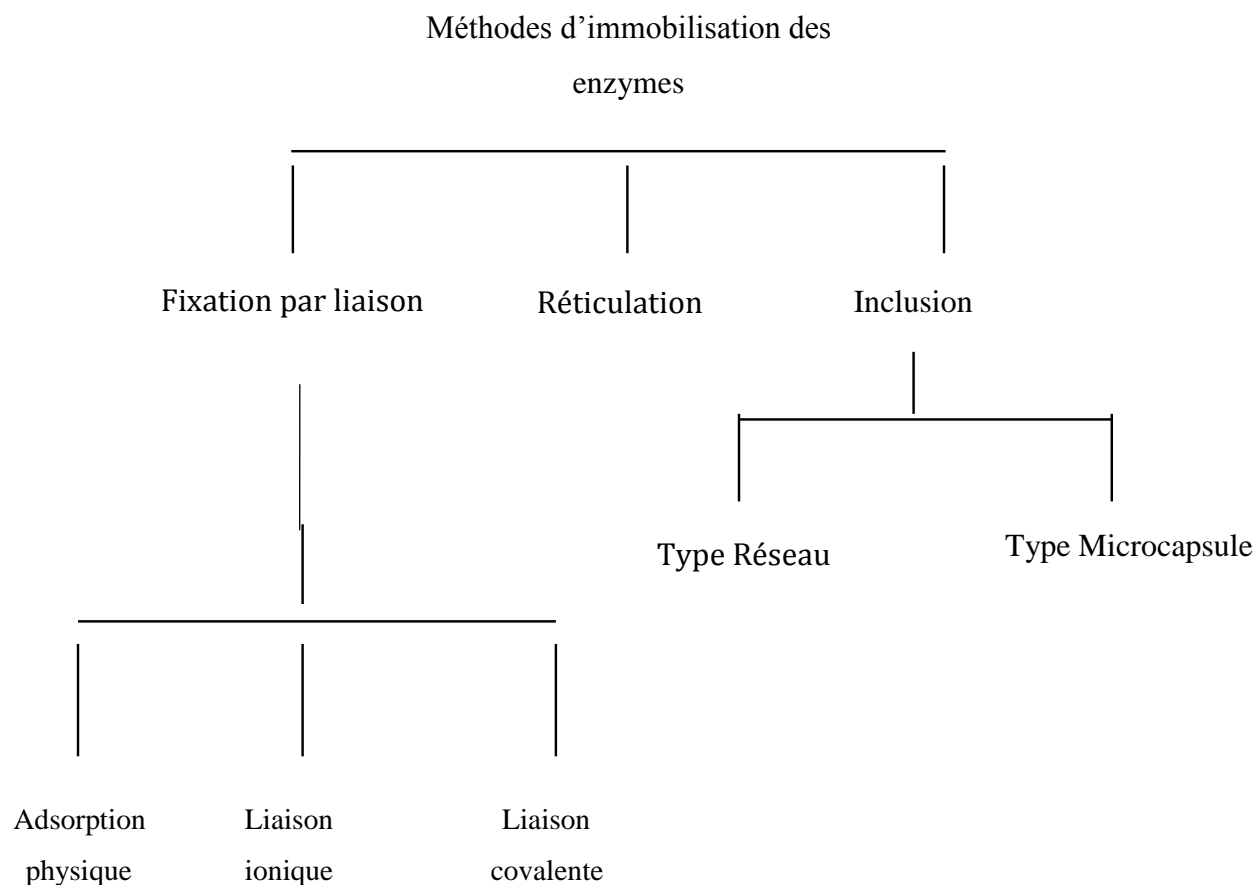


Figure 4- Méthode d'immobilisation des enzymes (Pitcher, 1980 & Brena et Batista, 2006).

Table 1 – Comparaison des méthodes d'immobilisation

Caractéristiques	Réticulation	Adsorption	Liaisons ioniques	liaisons covalentes	Encapsulation
Préparation	Intermédiaire	Facile	Facile	difficile	difficile
Force des liaisons	Elevée	Faible	intermédiaire	Elevée	intermédiaire
Activité enzymatique	Faible	Intermédiaire	Elevée	Elevée	faible
Utilisations	Impossible	Possible	Possible	Rare	impossible
Coûts	Intermédiaire	Faible	Faible	élevée	intermédiaire
Stabilité	Elevée	Faible	intermédiaire	élevée	élevée
Applicabilité	Non	Oui	Oui	Non	oui

### **I.5.4 Immobilisation par adsorption**

Parmi les diverses techniques d'immobilisation (Fig. 4), l'adsorption demeure la méthode la plus simple. La protéine enzymatique est liée à la surface d'un support par des interactions spécifiques de type hydrophobe, de Van der Waals ou ioniques. Un support est ajouté à la solution enzymatique et après quelques heures d'agitation, le système enzyme-support est prêt à être utilisé.

### **1.6 Utilisation des minéraux d'argile comme support d'immobilisation des enzymes**

Les argiles sont employées dans plusieurs domaines comme par exemple dans la purification, la décoloration des huiles minérales et alimentaires, les colorants, les produits cosmétiques et pharmaceutiques, dans l'élimination des virus, des pesticides, des herbicides et d'autres toxines. Ceci est relatif à leur surface spécifique élevée et à leurs propriétés d'adsorption (Secundo et al, 2008). La bentonite a été couramment utilisée comme support pour les catalyseurs. L'adsorption des composés organiques sur les argiles dépendent du type du composé et des propriétés intrinsèques de la solution. En plus de ces derniers, si on prend le cas de la montmorillonite, elle est acide de nature et les sites acides peuvent servir comme des moyens de fixation des protéines par les groupements  $\text{NH}_2$  (Cabreraa et al, 2008).

Selon Öztürk et al. (2008), la plupart des études menées sur l'immobilisation des enzymes sont orientée beaucoup plus, sur les variations de l'activité et sur les propriétés et la morphologie de minerai d'argile après l'immobilisation. Les études menée sur l'activité de l'enzyme ont été réalisées sur des réacteurs en batch, et sur des réacteurs à lit fluidisé ou remplis. Parmi ces travaux, on peut citer ceux immobilisant des enzymes sur des composés argileux-organiques, des matériaux d'argile intercalés par des ions métalliques et des argiles de synthèse (Secundo et al, 2008 & Scherer et al, 2011).

#### **I.6.1 Immobilisation des enzymes sur la bentonite**

Les travaux de la littérature relatifs à l'étude de la bentonite employée comme support d'immobilisation des enzymes est abondante. On peut en citer quelque auteurs incité par ce domaine de la recherche tels que l'Immobilisation des lipases (Scherer et al, 2001 & Yesiloglu, 2005 & Ghiaci et al, 2009), Pectinilyase (Spagna et al,1995) phosphatase (Ghiaci et al,2009),  $\alpha$ -amylase (Sedaghat et al ,2009), catalase (Cabreraa et al, 2008).

# Matériels et méthodes

### II.1 Matériel

#### II.1.1 Enzyme

L'enzyme utilisée dans cette étude est une phospholipase A1 (E.C.3.1.1.32). Cette enzyme est produite par modification génétique d'un micro-organisme et commercialisée sous le nom de Lécitase®Ultra par Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). Cette enzyme nous a été gracieusement donnée par Cevital Spa, Béjaïa. Les propriétés de la Lecitase®Ultra (PLA1) sont récapitulées dans le tableau II.1.

Tableau 2 – Propriétés de la Lecitase®Ultra (source Novozymes A/S, 2007)

Propriétés	
Forme physique	Liquide
Couleur	Brune
Micro-organisme producteur	<i>Aspergillus oryzae</i>
Micro-organisme donneur	<i>thermomyces lanuginosus</i>
Température de stockage	0 - 10 °C
Activité déclarée	10 KLU/g

#### II.1.2 Support pour l'immobilisation

Le support utilisé dans cette étude pour l'immobilisation de la PLA<sub>1</sub> est une bentonite activée aux acides. La bentonite et l'huile brute de Soja nous ont été fournis par Cevital . La bentonite n'a subi aucun traitement préalable au niveau du laboratoire. La dimension particulière de ce support est comprise entre 45 et 165  $\mu\text{m}$  et sa surface spécifique déterminée par la méthode de BET est de 167  $\text{m}^2\text{g}^{-1}$  (sources Cevital)

#### II.1.3 Autres produits et réactifs chimiques utilisés

- Les solutions de substrats employées pour évaluer l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme (Lecitase® Ultra) ont été préparées respectivement à partir de la lécithine (Cevital spa) et de l'huile d'olive purifiée (de la région de Kherrata).
- L'alcool polyvinylique (PVA) de marque Biochem Chemopharma, a été employé comme agent tensioactif dans la préparation des solutions de substrats.

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

- L'albumine du Sérum Bovin (ASB) et l'acide phosphorique et la soude (NaOH) sont de qualité ultra Pures (Cheminova).
- L'éthanol et le bleu de coomassie sont de marque Fluka.
- Le tampon utilisé dans cette étude a été préparé avec l'acide citrique et hydrogénât phosphate di-sodique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).
- Toutes nos solutions sont préparées avec de l'eau distillée.

### II.2 Méthodes

#### II.2.1 préparation des solutions tampons

Les solutions tampons à 0.05 N ont été préparé en s'inspirant des méthodes décrites dans *Lange's Handbook of Chemistry* (Dean, 1999). La solution tampon d'acide citrique (pH 4 - 8) a été préparée à partir de l'acide citrique (0.1 M) et Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.2 M) suivant le protocole recommandé par la littérature scientifique (Dean, 1999).

Tableau II.2 préparation des solutions tampons acide citrique à différents pH

pH	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml) (0.2 M)	Acide citrique (ml) (0.1M)
4	38.55	61.45
5	51.50	48.50
5.5	56.88	43.13
6	63.15	36.85
7	82.35	17.65
8	97.25	2.75

#### II.2.2 Méthode expérimentale utilisée pour l'immobilisation de la PLA<sub>1</sub>

La PLA<sub>1</sub> a été mélangée avec la solution tampon d'acide citrique à un rapport volumique 1:5. L'immobilisation par adsorption sur la bentonite a été réalisée en ajoutant au support la solution enzymatique selon un rapport volume/masse de 5:0,5. Les suspensions obtenues sont maintenues sous agitation constante à 250 rpm à l'air libre pendant deux heures. Ensuite, la bentonite est séparée par filtration (papier filtre Wattman) après lavage avec la solution tampon. Toutes les eaux de lavages récupérées sont soumises aux analyses des protéines.



### II.2.3 Méthodes analytiques

#### II.2.3.1 Dosage des protéines

La teneur en protéines de l'enzyme libre et des eaux de lavage a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), utilisant la BSA comme étalon (Wrolstad et al, 2005). (Le réactif de Bradford est préparé en mélangeant le bleu de coomassie G250 (10 mg) dans l'éthanol (5 ml, 95°) et l'acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (10 ml, 85%). Le mélange est complété avec l'eau distillé jusqu'à 100 ml. Le réactif est stocké à 4°C. Il est stable pendant plusieurs semaines). Après préparation des différentes dilutions de BSA, le réactif de Bradford (5 ml) est ajouté. On laisse agir 10 min à l'obscurité puis le dosage a été effectué par spectrophotométrie (UV mini-1240, SHIMADZU) à une longueur d'onde de 595 nm et la teneur en protéines a été déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage (Annexe 1).

#### II.2.3.2 Dosage de phosphore

La teneur en phosphore a été déterminé selon la méthode rapportée par (Yang et al, 2008) et effectuée selon le protocole suivant : 0.2 g de MgO et 2 g de l'huile sont calciné à 800 °C pendant 2 heures jusqu'à obtention de cendre blanche. Le dosage de phosphore a été déterminé par spectrophotométrie (UV mini-1240, SHIMADZU) à une longueur d'onde de 650 nm selon la méthode AOCS Ca 5a-40 (AOCS.1997). La courbe d'étalonnage (voir Annexe 2) a été utilisée pour déterminer la teneur en phosphore contenue dans l'huile brute et dans les échantillons d'huiles dégommees par l'enzyme immobilisée.

### II.2.4 Détermination de l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme

Pour déterminer l'activité lipasique et phospholipasique trois essais ont été réalisés pour chaque paramètre.

#### II.2.4.1 Activité lipasique

L'activité lipasique a été déterminée par la méthode titrimétrique comme décrite par Yang et al (2006). L'alcool polyvinylique à 4% et l'huile d'olive sont émulsionnés avec un rapport volumique 4 :1. Ensuite 5 ml de l'émulsion de l'huile d'olive et 5 ml de la solution tampon d'acide citrique (0.05 N) sont mélangés et la réaction est initiée par l'ajout de l'enzyme (immobilisée ou sous sa forme libre) et incubée pendant 10 min à 40°C pour l'enzyme libre et pendant 20 min à 55°C pour l'enzyme immobilisée sous agitation mécanique. La réaction est stoppée par l'ajout de 15 ml d'éthanol. Les acides gras libérés sont

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

---

titrés par une solution de NaOH (0.05 N) en utilisant la phénolphtaleine comme indicateur. Une unité lipasique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1  $\mu$ mole d'acides gras libres titrables par minute dans les conditions décrites ci-dessus. Les résultats sont exprimés sous forme d'activité relative exprimée par la relation II.1.

$$\text{Activité relative} = \frac{\text{L'activité enzymatique}}{\text{L'activité enzymatique maximal}} \times 100 \quad (\text{II.1})$$

### II.2.4.2 Activité phospholipasique

L'activité phospholipasique a été déterminée en utilisant la lécithine de soja à 10 % comme substrat. L'alcool polyvinylique à 4% et la lécithine de soja à 10 % sont émulsionnés avec un rapport volumique de 4:1. Les conditions d'analyse sont identiques à celle de l'activité lipasique.

### II.2.4.3 Effet de la durée d'incubation

Pour étudier l'effet du temps d'incubation sur l'activité lipasique et phospholipasique de l'enzyme libre et immobilisée, on a choisi des durées de 5 à 25 minutes à 40°C pour l'enzyme libre et 20 à 80 minutes à 55°C pour l'enzyme immobilisée.

### II.2.4.4 Effet de la concentration en protéine de la solution enzymatique

L'influence de la concentration en protéine sur l'activité lipasique et phospholipasique de l'enzyme libre et immobilisée a été déterminée dans un intervalle de concentration compris entre 9 et 36 mg/ml pour l'enzyme libre et entre 4 à 16 mg/ml pour celle immobilisée, avec un rapport substrat sur PVA de 4 :1.

### II.2.4.5 Optimisation du pH et de la température

Pour déterminer le pH optimal, l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme libre et immobilisée a été effectuée à différentes valeurs du pH de la solution tampon d'acide citrique (pH 4 - 8). La température optimale a été déterminée en variant les températures de 30 - 60 °C.

### **II.2.5 Essai de réutilisation de la PLA<sub>1</sub> immobilisée**

50,0 g d'huile de soja et 1g de la PLA<sub>1</sub>-bentonite ont été introduites dans un erlenmeyer de 250 ml, le pH est ajusté à 7 avec NaOH à 0,1 N. Le flacon est ensuite mis dans un bain marie réglé à 55 °C, sous agitation mécanique (300 rpm) pendant 3h. La PLA<sub>1</sub> immobilisées par la suite ont été filtrés, lavés avec de l'eau distillé et une solution tampon d'acide citrique à 0.05 N et séchés à la température ambiante. Les expériences de réutilisation ont été effectuées sur la même quantité d'huile brute en suivant le même protocole décrit ci-dessus.

### **II.2.6 Essai de dégomme enzymatique de l'huile de soja**

L'essai de dégomme de l'huile brute de soja a été réalisé en batch avec la PLA<sub>1</sub> libres et immobilisées en s'inspirant des conditions opératoires appliquées au niveau de la raffinerie des huiles Cevital (T 55°C ; pH 5.5) et recommandé par Novozymes (Yang et al, 2008). 200 ml de l'huile de soja et quelques gouttes d'acide citrique (36 %) pour fixer le pH, ont été placés dans un flacon de 500 ml, ensuite le mélange huile/acide citrique est chauffé à 80 °C sous agitation mécanique pendant une durée de 30 minutes. Au terme de cette durée, l'huile a été refroidie à 50 °C, puis le pH a été ajusté à 5.5-6.0 avec une solution de soude (NaOH 1N). La PLA<sub>1</sub> libre ou immobilisée a été ajoutée à l'huile. Le mélange a été incubée (50 °C) sous agitation mécanique (250 t/min) pendant 5 heures. Les échantillons pour l'analyse de phosphore ont été prélevés à des intervalles d'une heure.

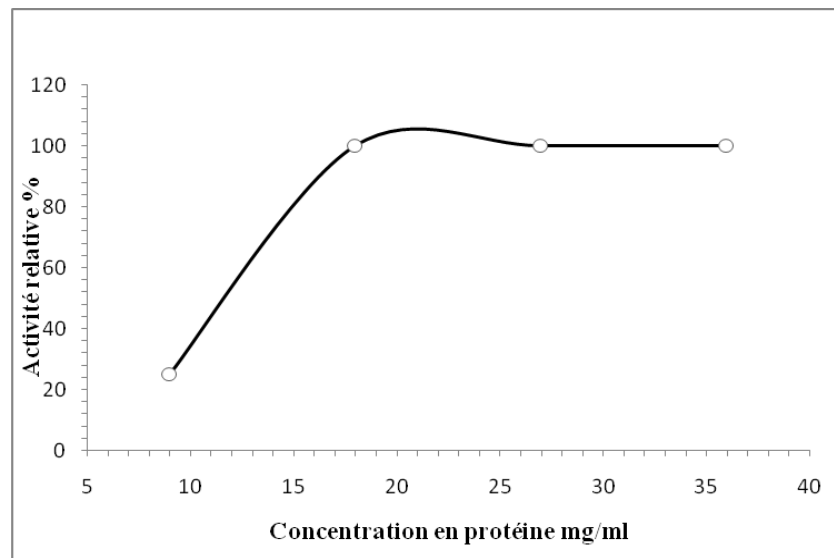
# Résultats et discussions

### III.1 Etude de l'Activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> libre

L'activité de la lipase a été mesurée en utilisant l'huile d'olive comme substrat. La méthode utilisée est celle décrite par Yang et al (2006).

#### III.1.1 Influence de la concentration de la solution enzymatique

L'évolution de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> en fonction de la concentration en solution protéique de l'enzyme est illustrée par les résultats tracés dans la figure 5



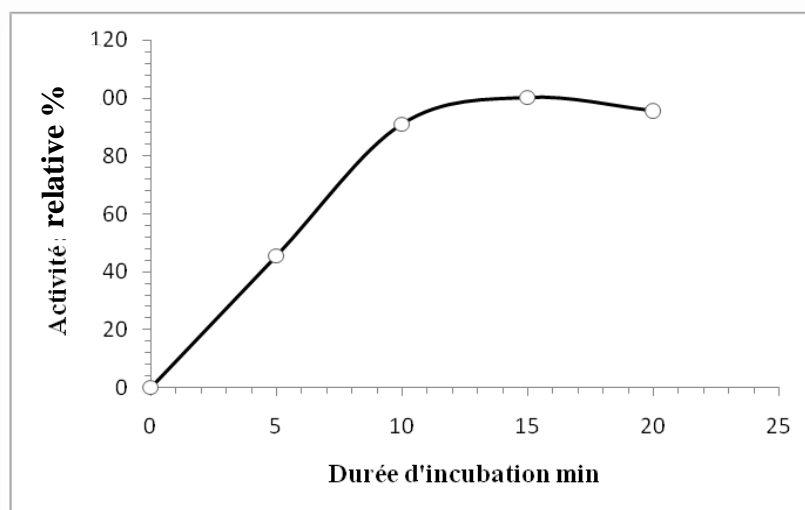
**Figure 5**– Evolution de l'activité lipasique en fonction de la concentration en protéine (Tampon acide citrique, pH 5.5; T= 40°C)

On observe une croissance linéaire entre la concentration en protéine et l'activité enzymatique jusqu'à 18 mg/ml correspondant à une activité de 220 U (Le 100% de l'activité relative = 220 U/ml = 220  $\mu$ mol/min). Au-delà de cette concentration un palier de saturation est atteint.

Cette évolution est semblable à celle observée par certain auteur (Al-Zuhair, 2003). Cette étude a montré que l'activité de la lipase de *Candida rugosa* augmente avec l'augmentation de la concentration en enzyme et attribue la présence du palier à l'existence d'un excès d'enzyme qui n'a pas réagit.

### III.1.2 Influence de la durée d'incubation

La variation de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> libre, en fonction de la durée d'incubation est présentée dans la figure 6.

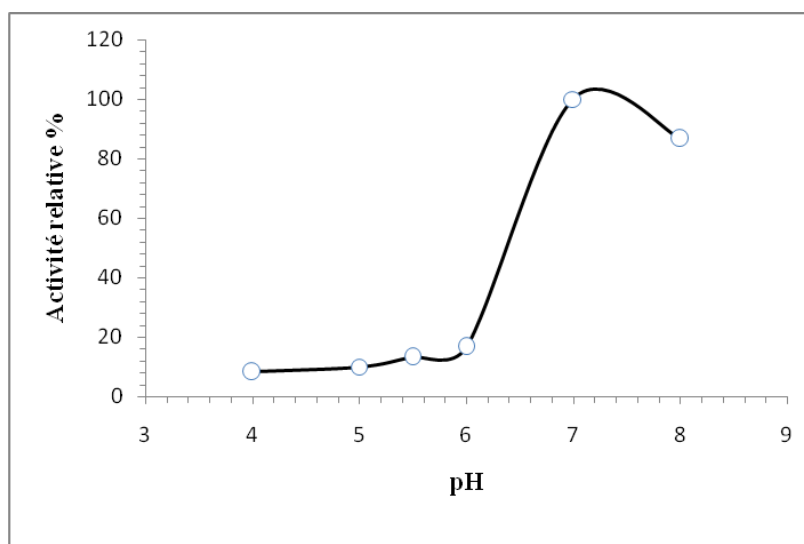


**Figure 6** : Evolution de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> libre en fonction de la durée d'incubation ([protéine] = 18 mg/ml, Tampon acide citrique, pH5.5, T = 40°C)

La figure ci-dessus montre une augmentation de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> pour atteindre un maximum après 10 min (200 U/ml) d'incubation à 45°C. Après cette durée, nous observons une stabilité de l'activité enzymatique où un palier est atteint.

### III.1.3 Influence du pH

La variation de l'activité de la PLA<sub>1</sub> libre en fonction du pH est illustrée dans la figure 7.



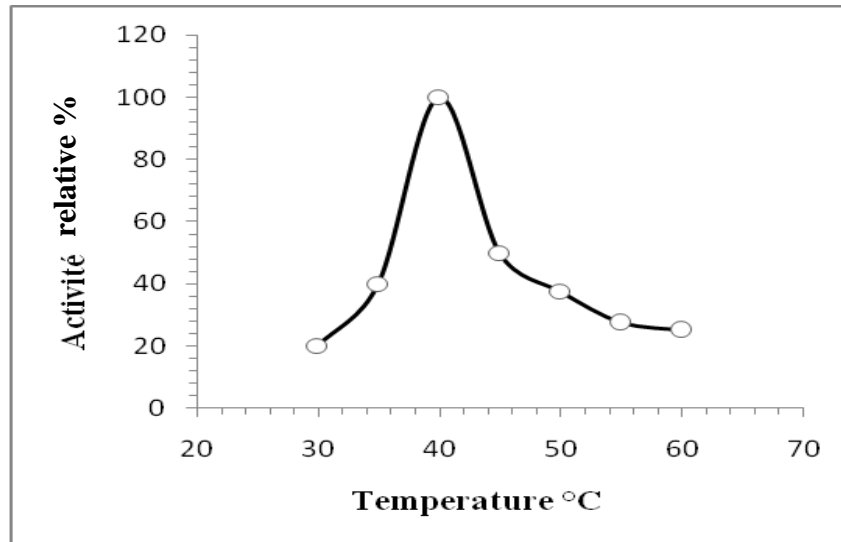
**Figure 7** – Evolution de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> libre en fonction du pH ([Protéine] = 18 mg/ml; T= 40°C ; 100% = 1500U/ml (μmol/min))

De celle-ci, on peut observer que l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> libre est hautement affectée par le pH acide du milieu réactionnel. En effet l'activité maximale est atteinte aux pH proche de 7, puis diminue aux pH alcalins. Ce qui nous mène à conclure que le pH optimum de la PLA<sub>1</sub> est de pH 7. Ce résultat concorde avec ceux de la littérature relatifs aux travaux sur la lipase d'origine végétale (Destain, 1996) et d'origine microbienne (Fabiano, 2002-Victor, 2004). Dans notre cas l'enzyme perd 45,6% de son activité à pH 6 et 23.3 % à pH 8 par rapport à son activité mesurée à pH 7.

Selon Augère (2001), cette diminution peut être attribuée à la modification du degré d'ionisation de certains groupements fonctionnels, dont la charge positive ou négative est indispensable à la transformation du complexe enzyme-substrat ou au changement de la conformation de la protéine, principalement au niveau du site actif.

### III.1.4 Influence de la température

Les résultats de l'évolution de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> libre en fonction de la température sont tracés dans la figure 8.



**Figure 8** – Evolution de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> libre en fonction de la température (pH 5.5; [protéine] = 18 mg/ml, temps = 15 min, 100% = 200U/ml ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ))

On observe que l'activité enzymatique augmente avec la température et atteint un maximum à  $T = 40^\circ\text{C}$ . Au-delà de cette température, l'activité diminue. Ceci indique que la PLA<sub>1</sub> possède une température optimale d'activité lipasique égale à  $40^\circ\text{C}$ . Ces résultats sont comparables à ceux de la littérature, obtenus sur une lipase d'origine végétale (Gao et al, 2008). Ce profil d'activité enzymatique de PLA<sub>1</sub> en fonction de la température est spécifique pour les enzymes en général. Selon certains auteurs (Fabiano et al, 2002):

- Une augmentation de l'activité avec la température est due à l'activation thermique;
- Une diminution de l'activité est due à des changements de conformation de l'enzyme, principalement au niveau des sites actifs.

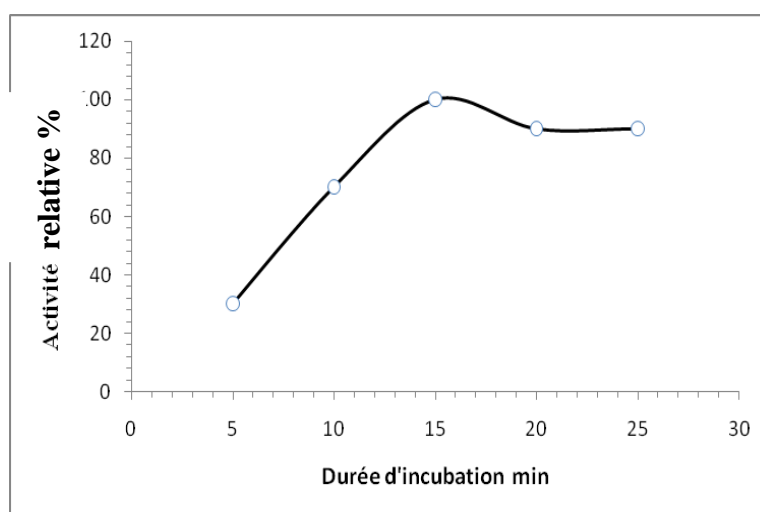
### III.2 Activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> libre

L'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> libre a été déterminée sur la lécithine du soja comme substrat. L'effet du pH, de la température, de la concentration en protéine et de la durée d'incubation a été étudié comme ci-dessous.

#### III.2.1 Influence de la durée d'incubation

La figure 8 représente la variation de l'activité phospholipasique relative de l'enzyme libre en fonction de la durée d'incubation à  $40^\circ\text{C}$ .



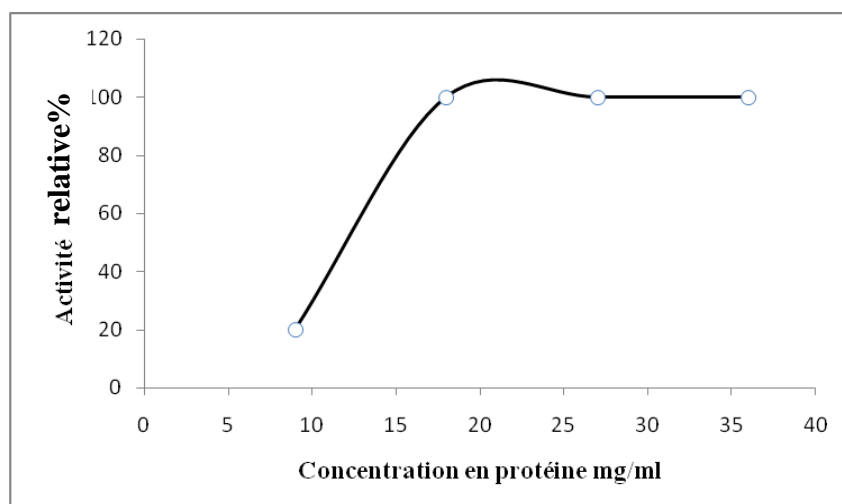


**Figure 9** – Influence de la durée d'incubation sur l'activité phospholipasique (pH 5.5 ; [protéine] = 18 mg/ml, T 40°C, 100% = 500U/ml ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ))

Il ressort de la figure 9 que l'activité phospholipasique maximale est atteinte après 15 min d'incubation à 40°C, au-delà duquel elle reste plus ou moins stable. Les courbes représentant la variation de l'activité phospholipasique et de l'activité lipasique ont la même allure.

### III.2.2 Influence de la concentration en protéine

La figure 10 représente la variation de l'activité phospholipasique relative de l'enzyme libre en fonction de la concentration en protéine de solution enzymatique.

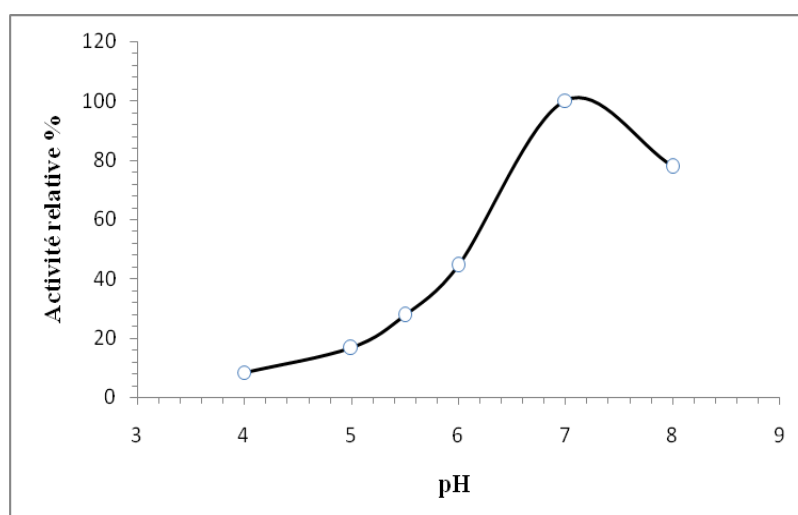


**Figure 10** – Evolution de l'activité phospholipasique en fonction de la concentration en protéine de la solution enzymatique (pH 5.5; T 40°C ; 100% = 500U/ml ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ))

La figure III.6, montre que l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> libre augmente linéairement avec la concentration en enzyme pour des concentrations inférieures à 18 mg/ml et atteint un maximum d'activité spécifique de 500 U. Au-delà de cette concentration un palier est atteint. Ce dernier peut être expliqué par l'excès en enzyme.

### III.2.3 Influence du pH

L'effet du pH sur l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> libre est illustré par la figure 11.



**Figure 11** – Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> libre en fonction du pH ([Protéine] : 18 mg/ml; T 40°C, 100% = 1800 U/ml ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ))

## Chapitre III : Résultats et discussions

L'activité phospholipasique augmente avec l'augmentation du pH et atteint un maximum à pH 7. Cependant, elle diminue au pH alcalin. On peut conclure que l'enzyme est hautement active aux pH proches de la neutralité.

Le fournisseur de l'enzyme, recommande d'utiliser la PLA<sub>1</sub> à pH acide [4 – 5.5], valeur maintenue en vigueur dans le procédé de dégommage au niveau de la raffinerie Cevital (Nielsen et al, 2003). Ceci trouve son explication ; que les opérateurs utilisent l'acide citrique pendant le dégommage des huiles végétales afin de chélater les métaux d'un côté, et de l'autre pour créer un milieu acide favorable à l'enzyme. Paradoxalement à cela, cette technique exige l'utilisation d'une grande quantité de soude afin d'ajuster le pH. La soude ajoutée en excès peut réagir avec les TAG pour former des savons et ainsi diminuer le rendement de l'huile. Ce qui nécessite aussi l'addition d'une étape de séparation des savons formés de l'huile et augmente le coût de fabrication de l'huile.

### III .2.4 Influence de la température

L'effet de la température sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre est représenté sur la figure 12.

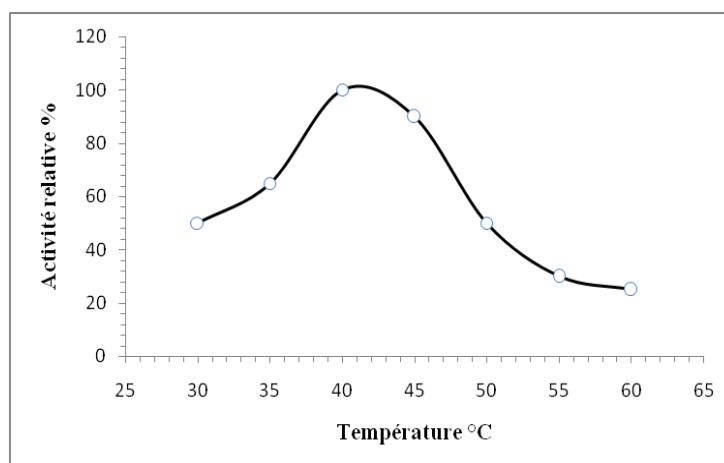


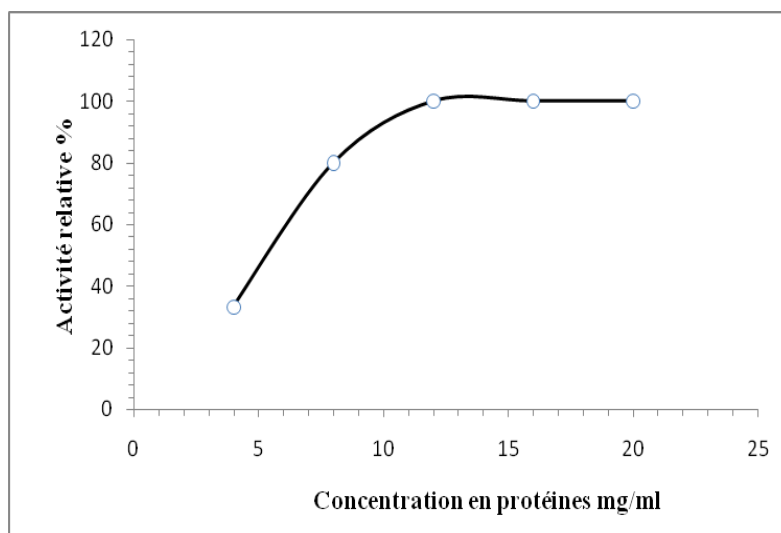
Figure 12 – Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA1 libre en fonction de la température (pH 5.5; [protéine] : 18 mg/ml ; 100% = 500U/ml ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ))

La figure 12, montre que l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> augmente linéairement pour atteindre un maximum d'activité spécifique de 500 U/ml à la température de 40°C. Au-delà de cette température l'activité diminue. Toutefois, il est admis que l'augmentation de la température de la réaction entrainera souvent une dénaturation irréversible de l'enzyme, c'est pourquoi l'activité diminue au-delà d'un seuil d'augmentation de la température.

### III.3 Activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée

#### III.3.1 Influence de la concentration en enzyme immobilisée

La variation de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée, en fonction de la concentration en protéine de la solution enzymatique est représentée par la figure 13.

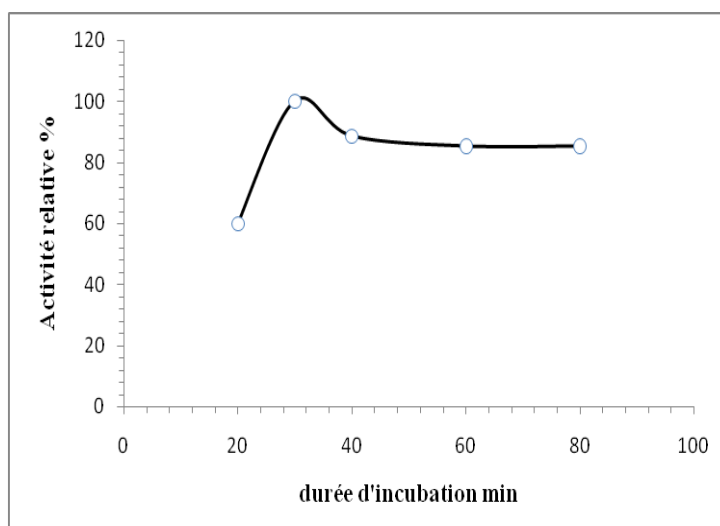


**Figure 13** – Evolution de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction de la concentration en enzyme (pH 7; T : 55°C, 100% = 800 U/ml (μmol/min))

D'après l'allure de la courbe, on observe que, l'activité lipasique de l'enzyme augmente avec l'augmentation de la concentration en protéine, pour atteindre un maximum pour une concentration de 12 mg/ml correspondant à une activité de 800 U/ml. Au-delà de cette concentration, un palier est atteint. Ceci s'explique par la présence d'un phénomène d'encombrement stérique au niveau de la surface de support et de ce fait empêchera l'accès des molécules du substrat au site actif de l'enzyme.

#### III.3.2 Influence de la durée d'incubation

La variation de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée, en fonction de la durée d'incubation à 40°C est représentée par la figure 14.

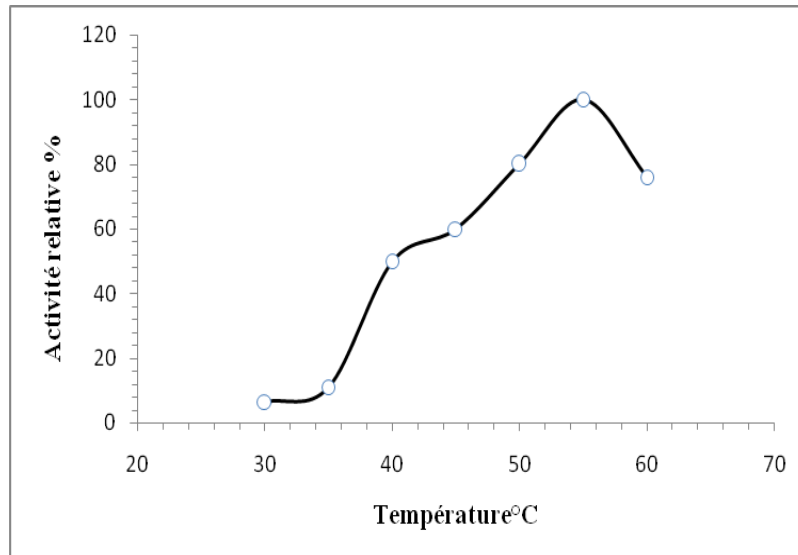


**Figure 14** – Evolution de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction de la durée d'incubation (pH 7; [protéine] : 10 mg/ml ; 100% = 625U/ml ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ))

D'après la figure 14, on peut observer une perte de l'activité enzymatique après 30 min de temps d'incubation. On peut suggérer que ce phénomène serait dû à une désorption de l'enzyme. Cette désorption est due à la rupture des faibles liaisons liant l'enzyme à son support. On peut aussi stipuler que la baisse de l'activité peut avoir comme origine la saturation en substrat au niveau de l'interface enzyme-support.

### III.3.3 Influence de la température

L'évolution de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction de la température (Fig.15)



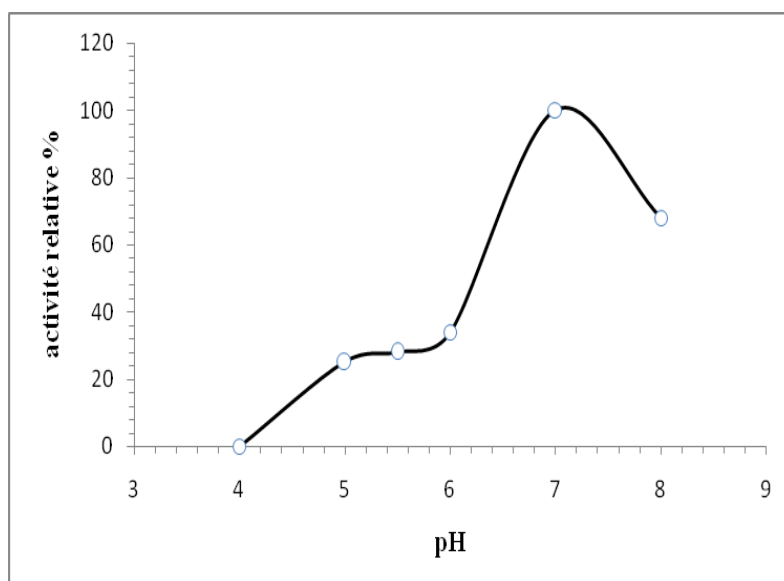
**Figure 15** – Evolution de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction de la température (pH 7; [protéine] : 10 mg/ml ; 100% = 675U/ml)

La Figure 14 montre que l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée augmente avec l'augmentation de la température du milieu réactionnel jusqu'à une valeur optimale de 55 °C puis diminue. Ce profil est spécifique aux enzymes en générale où il y a une augmentation de l'activité au fur et à mesure que la température augmente pour donner naissance à une activation thermique. La diminution de l'activité est due aux changements de la conformation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme, provoquée par les températures supérieures à 55°C principalement au niveau des sites actifs (Gao, 2008).

En général, les enzymes immobilisées sont plus stables et plus actives, mais la température et le pH peuvent altérer les interactions (par adsorption) entre l'enzyme et le support utilisé, ce qui provoque leur désorption et par conséquent une diminution de leur activité (Bergaya et al, 2006).

### III.3.4 Influence du pH

L'évolution de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction du pH est tracé dans la figure. 16.



**Figure 16** – Evolution de l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction du pH ([protéine] : 10 mg/ml, T 55°C ; 100% = 950U/ml (μmol/min))

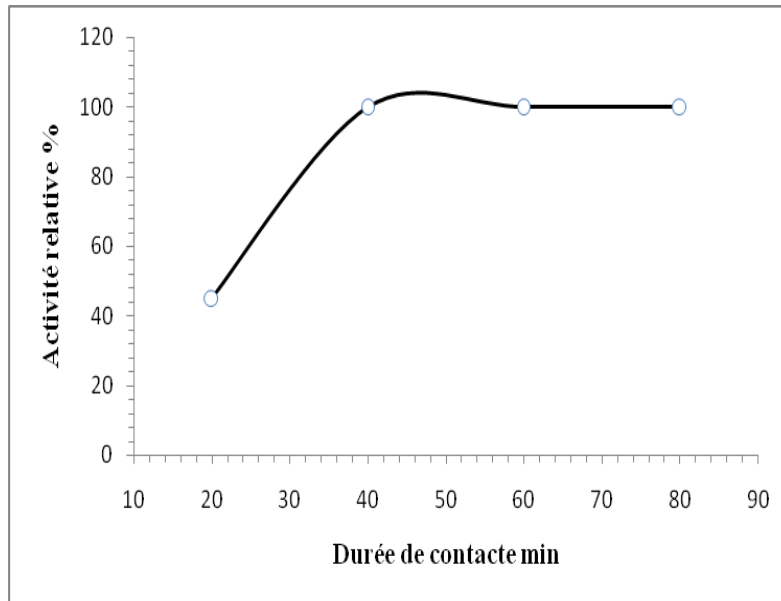
Les résultats obtenus dans la figure 16 montrent que l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée est proportionnelle aux variations du pH jusqu'à une valeur maximale égale à 7. Ces résultats diffèrent légèrement avec ceux résultats obtenus par Salis (2008), où les lipases d'origine microbiennes (*pseudomonas fluorescence* et *pseudomonas cepacia*) ou fongique (*pencillium commembertii*; et *rhizopusoryzae* et *candida rugosa*) immobilisées sur un polypropylène avaient un pH optimal de 6.

Dans ce cas, l'effet du pH observé, ne peut être expliqué que par un changement probable de conformation de la protéine qui, à pH 7 présente une conformation dont la surface possède un maximum de site de fixation qui serait en bonne interaction avec le support.

### III.4 Activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée

#### III.4.1 Influence de la durée d'incubation

La variation de l'activité de PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction de la durée d'incubation est représentée par la figure 17.



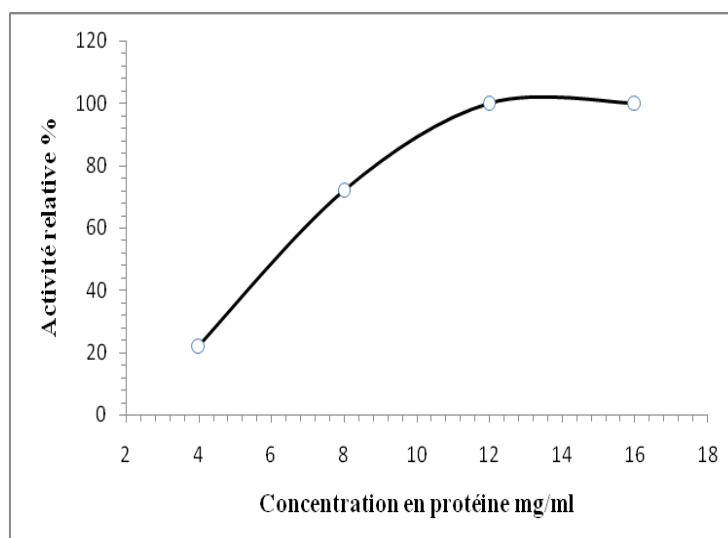
**Figure 17** – Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction de la durée d'incubation (pH 7; T : 55°C, 100% = 1000U/ml ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ))

De la figure 17, on peut observer une stabilisation de l'activité enzymatique après 40 min de temps d'incubation à 55°C. On peut aussi formuler que la baisse de l'activité peut avoir comme origine la saturation en substrat au niveau de l'interface enzyme-support.

### III.4.2 Influence de la concentration en protéine

La variation de l'activité de PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction de la concentration en protéine de la solution enzymatique immobilisée est représentée dans la figure 18.



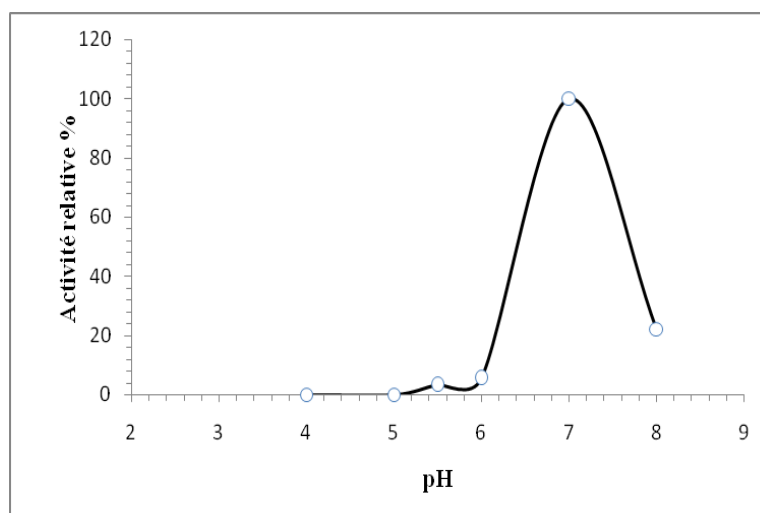


**Figure 18** – Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction de la concentration en protéine (pH 7; T : 55°C; [protéine] : 10 mg/ml, 100% = 900U/ml (µmol/min))

De la figure 18, on peut remarquer que la courbe qui représente l'évolution de l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée sur la bentonite a la même allure que celle qui représente l'activité phospholipasique de l'enzyme libre. Ceci s'explique par la présence d'un phénomène d'encombrement stérique au niveau de la surface de support et de ce fait empêchera l'accès des molécules du substrat au site actif de l'enzyme.

### III.4.3 Influence du pH

La variation de l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> en fonction du pH est représentée dans la figure 19.

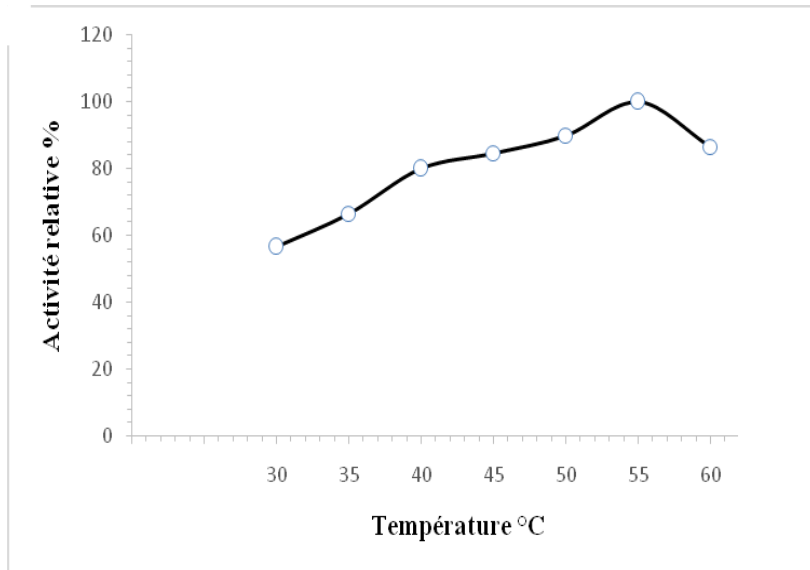


**Figure 19** – Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction du pH (T : 55°C); [protéine] : 10 mg/ml, 100% = 1025U/ml (μmol/min))

L'activité phospholipasique augmente légèrement avec l'augmentation du pH et atteint un maximum égal à 7. Cependant, elle diminue au pH alcalin. On peut stipuler que l'enzyme est hautement active à pH neutre. Cette observation dans le comportement de l'enzyme (allure identique) traduit le même phénomène que pour l'activité phospholipasique de la l'enzyme libre en fonction du pH.

### III.4.4 Influence de la température

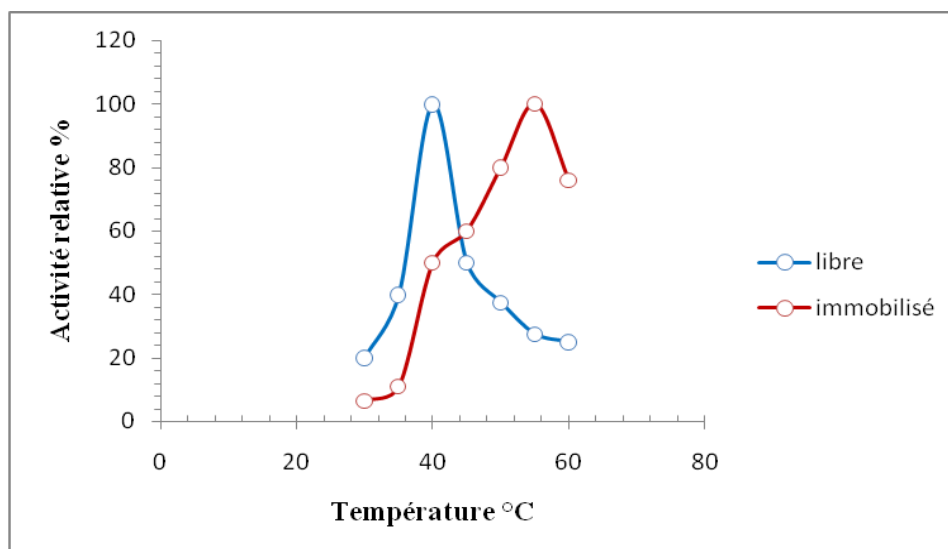
L'évolution de l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction de la température est illustrée par la figure 20.



**Figure 20** – Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction de la température (pH 7; [protéine] : 10 mg/ml, 20 min)

On peut conclure que l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée a la même allure et même optimum que celle de l'activité lipasique immobilisée. Cependant, les valeurs des activités phospholipasique sont plus élevées car la PLA<sub>1</sub> est plus active en présence de la lécithine car l'enzyme est spécifique à son substrat.

### III.5 Comparaison entre l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction de la température

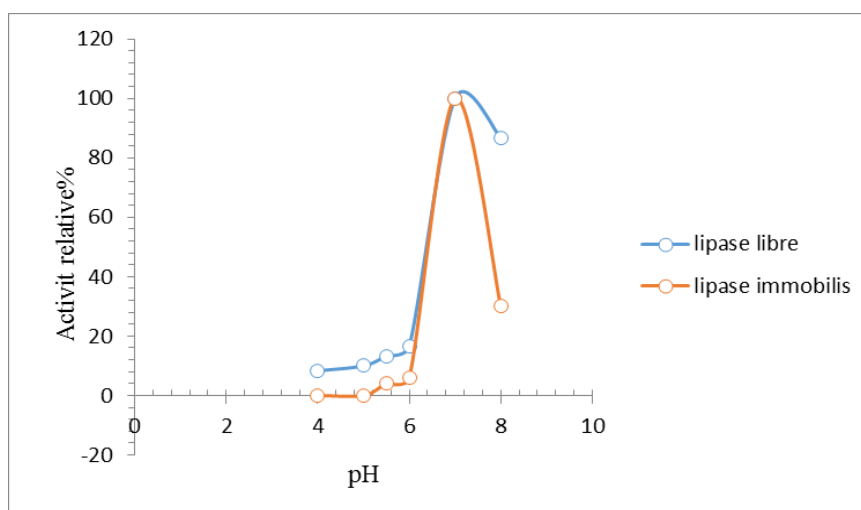


**Figure 21** : représente la comparaison entre l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction de la température.

Nos résultats montrent que la température optimale de l'enzyme libre est de 40 °C. Elle est égale à 55 °C pour l'enzyme immobilisée. L'enzyme immobilisée montre aussi une activité beaucoup plus élevée que l'enzyme libre, ce qui indique une amélioration de la résistance de la protéine enzymatique à la dénaturation thermique résultant de la structure rigide renforcée par l'immobilisation. Par conséquent, cette propriété importante de l'enzyme immobilisée à savoir la résistance aux températures élevées est largement appréciée par les industriels leur permettant une large gamme d'applications de l'enzyme immobilisée.

L'amélioration qu'apporte l'augmentation de la température, s'explique par le fait que les protéines donnent au support une structure tridimensionnelle partiellement ramifiée, qui débouche sur un nombre de sites d'interaction plus grand (Salis et al, 2008).

### III.6 Comparaison entre l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction du pH

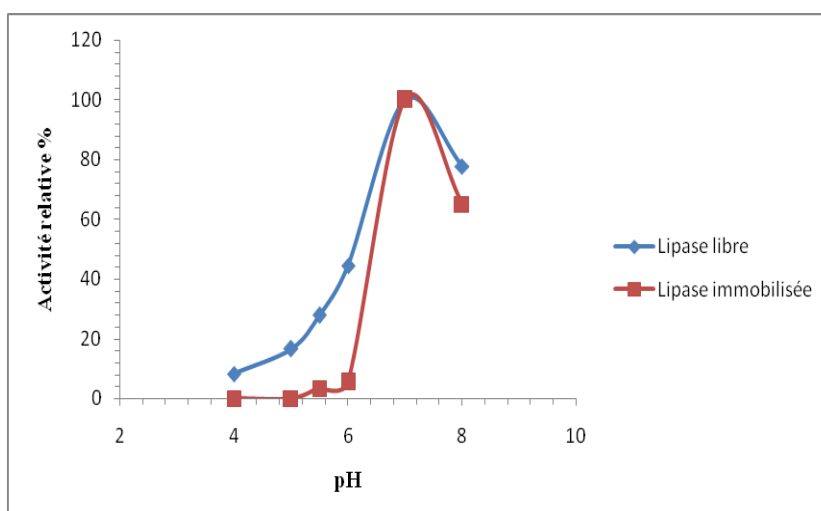


**Figure 22**– Comparaison entre l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction du pH (T : 55)

L'effet du pH sur l'activité lipasique de la PLA<sub>1</sub> immobilisée et celle libre dans l'hydrolyse de l'huile d'olive est déterminée en faisant varier le pH du milieu de la réaction de 4 à 8. Comme le montre la figure 22, l'optimal est égale à 7 pour à la fois l'enzyme libre et immobilisée. Ce qui indique que le pH optimal de la PLA<sub>1</sub> n'a pas été modifié après

l'immobilisation. De plus, l'enzyme immobilisée a montré une légère différence de son activité par rapport à celle de l'enzyme libre, ce qui indique que l'immobilisation donnerait une meilleure stabilité aux pH élevée comparativement à l'enzyme libre. Ceci est le résultant de la rigidité renforcée de la structure de protéine, donnée par le support. D'autre part une récente étude menée par Yu et al (2012) montre que le pH optimal pour l'hydrolyse de l'huile de soja, c'est-à-dire, l'hydrolyse des TAG avait été de 6.8, ce qui confirme encore nos résultats.

### III.7 Comparaison entre l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction du pH



**Figure 23** – Comparaison entre l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction du pH

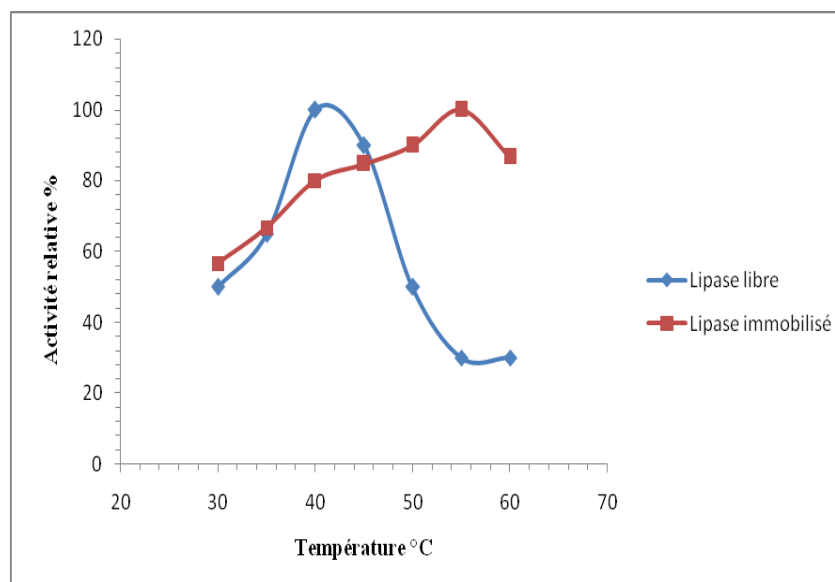
De la figure 23, le pH optimum de l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> libre et immobilisée est égale à 7.0, ce qui indique que l'enzyme qu'elle soit libre ou immobilisée hydrolyse les phospholipides dans les mêmes conditions du pH. Cependant, dans ces mêmes conditions, l'enzyme attaque aussi les TAG comme le montre la figure 22. Mais il reste que l'activité phospholipasique domine l'activité lipasique. Les résultats des travaux menés par Yu et al (2012), sur la phospholipase A<sub>1</sub> immobilisée sur trois supports différents, notent une activité optimale plus élevée après immobilisation, En effet, ces auteurs rapportent que le pH optimal de la PLA<sub>1</sub> libre avait été de 5.5 et augmente d'une unité et passe à 6.5 pour la PLA<sub>1</sub> immobilisée.

## Chapitre III : Résultats et discussions

On constate que l'activité de l'enzyme immobilisée a le même pH optimal d'activité que l'enzyme libre. La PLA<sub>1</sub> à l'état libre a une activité de 1800 U/ml pour une concentration en enzyme de 18 mg/ml, alors qu'à l'état immobilisée elle manifeste une activité de 2050 U/gramme de support pour une concentration en enzyme de 20 mg/ml. On peut conclure que l'enzyme manifeste une activité plus élevée à l'état immobilisée qu'à l'état libre.

### III.8 Comparaison entre l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction de la température

La figure 24 montre une comparaison de l'activité phospholipasique en fonction de la température entre les deux lipases libres et immobilisée.

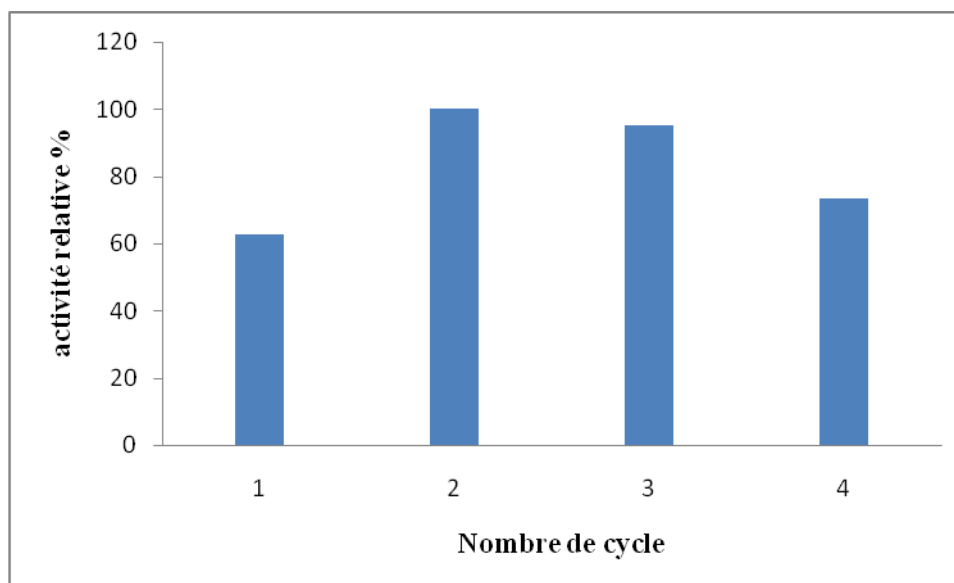


**Figure 24** – Comparaison entre l'activité phospholipasique de la PLA<sub>1</sub> libre et immobilisée en fonction de la température

Pour le cas de la température, il est bien évident que l'immobilisation a pu déplacer l'optimum de 40 °C à 55 °C. De plus, la PLA<sub>1</sub> immobilisée semble avoir une résistance thermique plus prononcée que son homologue libre vu que cette dernière affiche une décroissance rapide de son activité au delà de 40 °C. Encore une fois, ceci traduit l'augmentation de la stabilité de l'enzyme après immobilisation. En effet, l'enzyme immobilisée a pu conserver plus de 90 % de son activité sur une gamme de températures

allant de 50 à 60 °C par rapport à l'enzyme libre. Un déplacement dans l'optimum de température vers les grandes valeurs pour la PLA<sub>1</sub> immobilisée a été aussi observé par certain auteur (Yu et al, 2012).

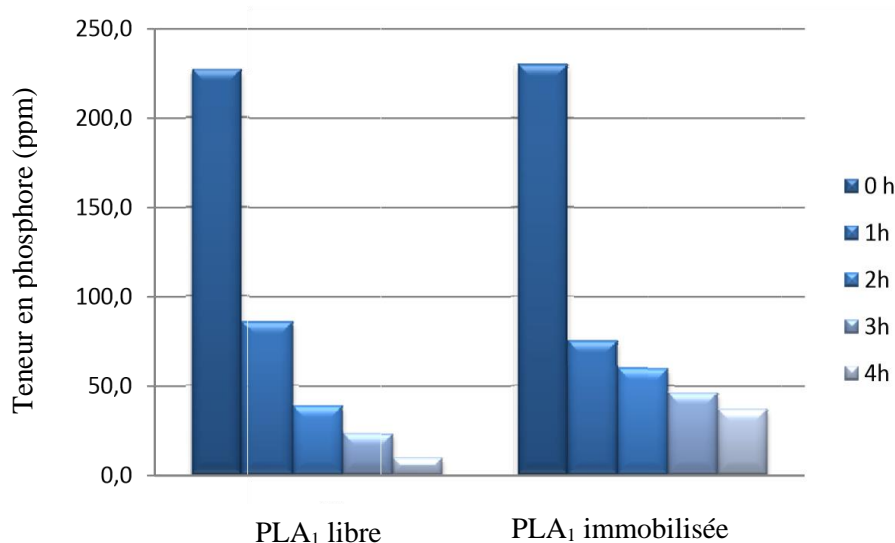
### III.9 Réutilisation de la PLA<sub>1</sub> immobilisée



**Figure 25** – Evolution de l'activité PLA<sub>1</sub> immobilisée en fonction du nombre de cycle d'utilisation

Nos résultats montrent que la PLA<sub>1</sub> immobilisée sur la bentonite garde une activité de l'ordre de 73 % de son activité maximale autrement dit après quatre cycles d'utilisation. Il est important de souligner la difficulté liée à la récupération (perte du support dans la phase huile et aussi l'élimination de l'huile de support après lavage) du support après son utilisation, ceci nous a limité le nombre de cycle uniquement à 4, d'où nous suggérons d'initier la réaction en colonne au lieu d'un fonctionnement en batch. Toutefois, il est important de noter que le nombre de cycles (04 cycles) de réutilisation est proche du nombre communément retrouvé par certain auteur. Les travaux de la littérature rapportent que Dizge et al (2009) a constaté que la lipase de *thermomyces lanuginosa* immobilisée sur le styrène-divinyl benzène conserve son activité après 5 cycles et Zhang et al (2008) a montrés que la lipase de *pseudomonas cepacia* immobilisée sur la silice conserve jusqu'à 88% de son activité après 6 cycles d'utilisation.

### III.10 Dégommage de l'huile de soja avec la PLA<sub>1</sub> libre et immobilisée



**Figure 26 :** Hydrolyse des phospholipides par la PLA<sub>1</sub> immobilisée et libre (Conditions des essais : T 55 °C, pH 5.5)

Les PLA<sub>1</sub> immobilisée et libre ont été utilisées pour réduire le contenu en phospholipide de l'huile de soja. Le teneur initiale en phosphore de l'huile de soja est entre 227 à 230 ppm. La température et le pH ont été fixés à 55°C et 5,5 respectivement. La figure 24 représente l'évolution de la teneur en phosphore après 4 heures de traitement.

La PLA<sub>1</sub> permet de réduire la teneur en phosphore à 9,7 ppm après 4 heures de traitement, alors que la PLA<sub>1</sub> immobilisée a une vitesse de décroissance plus lente et ramène la teneur en phosphore de l'huile de soja à 37,1 ppm. La teneur en phosphore résiduelle obtenue avec la PLA<sub>1</sub> libre (inférieure à 10 ppm) qui est appropriée au raffinage physique de l'huile de soja. Cependant, la réduction de la teneur en phosphore obtenue avec la PLA<sub>1</sub> immobilisée est supérieure à cette valeur. Le résultat indique que l'enzyme libre était plus mobile et plus accessible aux substrats (phospholipides). Cependant la PLA<sub>1</sub> immobilisée exige plus de temps de contact.



# Conclusion

Dans ce travail, nous avons pu fixer par adsorption une enzyme, la Lecitase<sup>®</sup>Ultra sur un support de bentonite comme support d'immobilisation de la PLA<sub>1</sub>. Les résultats obtenus montrent que la Lecitase<sup>®</sup>Ultra possède une activité phospholipasique et lipasique relativement importante. Toutefois, en présence des phospholipides comme substrat, l'activité de la phospholipase prédomine. Il est important de souligner ce résultat, puisque l'enzyme peut identifier la nature des triglycérides à hydrolyser et les phospholipides sont les constituants majeurs à éliminer des huiles au cours du processus de dengommage. Cette propriété de l'enzyme permet de minimiser les pertes de l'huile et de ramener les teneurs en phosphores à des valeurs relativement basses et par conséquent produire une huile alimentaire raffinée de qualité.

A l'état libre comme à l'état immobilisée, l'enzyme présente un pH optimal proche de 7 ce qui indique que le support n'avait pas d'effet significatif sur le pH optimal de l'enzyme. Cependant, il a un effet significatif sur la température. En effet, la température optimale a augmenté jusqu'à 55 °C pour l'enzyme immobilisée alors qu'elle avait une température optimale de 40 °C dans son état libre.

De plus, nos résultats montrent que la durée de contact idéal est de 30 minutes, pour une concentration en enzyme immobilisée de 12 mg/ml. D'autre part, la phospholipase immobilisée sur la bentonite est évaluée en fonction du nombre de cycles de réutilisation. Les résultats montrent une activité stable pendant 4 cycles d'utilisation. Au-delà de ce nombre, l'activité diminue progressivement.

La PLA<sub>1</sub> immobilisée possède une bonne capacité dans l'élimination des composés phospholipidiques, cependant ceci n'est qu'un début qui nécessite plus de recherche.

## -A-

- AOCS. (1997). Champaign. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society, Ca. 12-55.*
- Al-Zuhair S., Hasan M., Ramachandran K. B. (2003). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*. 38: 1155-1163.
- Augère B. (2001). *Les enzymes, biocatalyseurs protéique*. Edition : Ellipses. Paris 223p.

## -B-

- Bergaya F.; Theng B. K. G.; Lagaly G. (2006). *Handbook of Clay Science: Developments in Clay Science*, volume 1. Elsevier Ltd.
- Brena B. M.; Batista-Viera F. (2006). *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Chapter Immobilization of Enzymes: A Literature Survey, pp 15 – 30. Humana Press Inc., Totowa, NJ, Second Edition.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anl. Biochem.* 72: 248-254.
- Burchholz K.; Kasche V.; Bornscheuer U.T. (2005). *Biocatalysts and Enzyme Technology*. WILEY-VCH, Weinheim.

## -C-

- Cabreraa Z.; Fernandez-Lorenteb G.; Palomoa J. M.; Guisana J. M.; Fernandez-Lafuentea R. (2008). Asymmetric hydrolysis of dimethyl 3-phenylglutarate catalyzed by lecithase ultra, effect of the immobilization protocol on its catalytic properties. *Enzyme Microb Tech*, 43 :531 – 536.
- Casado V.; Martin D.; Torres C.; Reglero G. (2008). Lipases and phospholipases : Methods and protocols, methods in molecular biology. *Springer Science.; Business Media*, pp 495 – 523.

## **-D-**

- Dean J. A.; (1999). *Lange's Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill, Inc.
- Destain J.; Roblain D.; Thonart P. (1997). Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett*, 19: 105 – 107.
- Dijkstra A.J. (2010). Enzyme degumming. *EUR J Lipid Sci Technol*, 112 :1178- 1189.
- Dizge N.; Keskinler B.; Tanriseven A. (2009). Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochem Eng J.*, 44: 220 – 225.
- Durand G et Monson P.(1982). Les methods d'immobilisation des enzymes. Bordas,Paris.

## **-F-**

- Fabiano S. (2002). Immobilisation d'enzymes dans des films de polymère conducteur : PEDT. Application à la réalisation de biocapteurs ampérométriques pour le dosage du glucose et des composés phénoliques. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard-Lyon I, 161p
- Fernandez-Lorente G.; Filice M.; Lopez-Vela D.; Pizarro C.; Wilson L.; Betancor L.; Avila Y.; Guisan J. M. (2011). Cross-linking of lipases adsorbed on hydrophobic supports: Highly selective hydrolysis of fish oil catalyzed by rml. *J Am Oil Chem Soc*, 88:801 – 807.
- Forde J.; Vakurov A.; Gibson T.D.; Millner P.; Whelehan M.; Marison I.W.; Fagaina C.O. (2010). Chemical modification and immobilization of lipase b from *candida antarctica* onto mesoporous silicates. *J Mol Catal B-Enzym*, 66: 203 – 209.

## **-G-**

- Galhardo F.; Dayton C. 2012.Edible oil processing: Enzymatic degumming. *Am Oil Chem Soc*. Grim R.E.; Guven N. (1978). *Developments in sedimentology 24, Bentonites : Geology, Mineralogy, Properties and Uses*. Elsevier Scientific Publishing Company, AE Amsterdam, The Netherlands.

- Gao S.; Wang Y.; Luo G.; Dai Y. (2008). Immobilisation of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. *Bioresource Technol*, 100, 996 – 999.
- Ghiaci M.; Aghaei H.; Soleimanian S.; Sedaghat M.E. (2009). Enzyme immobilization part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Appl Clay Sci*, 49: 289 – 295.
- Ghiaci M.; Aghaei H.; Soleimanian S.; Sedaghat M.E. (2009). Enzyme immobilization: Part 2 immobilization of alkaline phosphatase on Na-bentonite and modified bentonite. *Appl Clay Sci*, 43:308 – 316.

### -I-

- Iwai MJ et Tsujisaka Y. (1964). Interconversion of Two Lipases from *Rhizopus delemar*. *Agr. Biol. Chem.* 38 : 1249-1254.

### -J-

- Ji-Guo Yang; Yong-Hua Wang; Bo Yang., Geoffrey Mainda ; Yong Guo. (2006). Degumming of Vegetable Oil by a New Microbial Lipase. *Food Technol. Biotechnol.* 44 : 101–104.

### -K-

- Katchalski-Katzir E.; Kraemer D.M. Eupergit R. C. (2000). A carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J Mol Catal B-Enzym*, 10:157 – 176.
- Khare S.K.; Nakajima M. (2000). Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil. *Food Chem*, 68:153 – 157.

### -L-

- Luckarift H.R.; Spain J.C.; Naik R.R.; Stone M.O. (2004). Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nat. Biotechnol.*, 22 : 211 – 213.

## **-M-**

- Mansee A.H.; Chen W.; Mulchandani A. (2005). Detoxification of the organophosphate nerve agent coumaphos using organophosphorus hydrolase immobilized on cellulose materials. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32 : 554 – 560.
- Mishra M.K. ; Kumaraguru T. ;Sheelu G. ; Fadnavis N.W. (2009). Lipase activity of lecitase<sup>®</sup>ultra : characterization and applications in enantioselective reactions. *Tetrahedron Asymmetr*, 20 :2854- 2860.
- Monsan P.; Lopez A. (1981).On the production of dextran by free and immobilised dextransurase. *Biotechnol Bioeng*, 23 : 2027 – 2037.

## **-N-**

- Nielsen M.; Cowan D. (2003). *Lecitase Ultra: Enzymatic Degumming Manual*. Novozymes.
- Nelson JM., Griffin EG. (1916). Adsorption of invertase. *J Am Chem Soc*. 38: 1109-1115.

## **-O-**

- Özturk N.; Tabak A.; Akgöl S.; Denizli A. (2008). Reversible immobilization of catalase by using a novel bentonite-cysteine (bent-cys) microcomposite affinity sorbents. *Colloid Surface A*, 322:148 – 154.

## **-P-**

- Pitcher W.H. (1980). *Immobilized enzymes for food processing*. CRC Press, Florida.

## **-R-**

- Rodrigues R.C.; Godoy C.A.; Volpato G.; Ayub Marco A.Z.; Fernandez-Lafuente R.; Guisan J.M. (2009). Immobilization - stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* : Critical role of chemical amination. *Process Biochem*, 44 : 963 – 968.

## -S-

- Salis A.; Pinna M.; Mouduzzi M.; Solinas V. (2008). Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. *J Mol Catal B-Enzym*, 8: 1 – 8.
- Scherer R.; Oliveira J.V.; Pergher S.; de Oliveira D. (2011). Screening of supports for immobilization of commercial porcine pancreatic lipase. *Mat. Res.*, 14: 4.
- Secundo F.; Miché-Brendlé J.; Chelaru C.; Ferrandi E. E.; Dumitriu E. (2008). Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Micropor Mesopor Mat*, 109 : 350 – 361.
- Sedaghat M.E.; Ghiaci M.; Aghaei H.; Soleimani-Zad S. (2009). Enzyme immobilization. part 3 immobilization of  $\alpha$ -amylase on Na-bentonite and modified bentonite. *Appl Clay Sci*, 46 : 125 – 130
- Sheelu G.; Kavitha G.; Fadnavis W.N. (2008). Efficient immobilization of lecithase in gelatin hydrogel and degumming of rice bran oil using a spinning basket reactor. *J Am Oil Chem Soc*, 85 :739 – 748.
- Spagna G.; Pifferi P.G.; Gilioli E. (1995). Immobilization of a pectinlyase from *aspergillus niger* for application in food technology. *Enzyme Microb Technol*, 17 : 729 – 738.
- Spahn C.; Minteer S.D. (2008). Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent Patents on Engineering*, 20 :195-200.

## -T-

- Tanaka A et Tosa T.(1993). *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. Marcel Dekker,INC.

- Tischer W.; Kasche V. (1999). Immobilized enzymes: crystals or carriers, *Trends Biotechnol.*, 17(8): 326 – 335.
- Tischer W.; Wedekind F. (1999). Immobilized Enzymes: Methods and Applications, In : Topics in Current Chemistry, volume 200. Springer Verlag Berlin Heidelberg.

**-V-**

- Victor N. Enujiugha. ; Fatima A. Thani., Tajudeen M. Sanni., Roland D. Abigor.(2004). Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth). *Food Chemistry* 88 : 405–410.
- Vulfson E.N.; Halling P.J.; Holland H.L. (2001). *In: Enzymes in nonaqueous solvents : methods and protocols*, pages 151–172. Humana Press, Totowa.

**-W-**

- Wrolstad R.E.; Acree T.E.; Decker E.A.; Penner M.H.; Reid D.S.; Schwartz S.J.; Shoemaker C.F.; Smith D.; Sporns P. (2005). *Handbook of Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.

**-Y-**

- Yang J-G.; Wang Y-H.; Yang B.; Mainda G.; Guo Y. (2006). Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase. *Food Technol Biotechnol*, 44: 101 – 104.
- Yang B.; Wang Y-H.; Yang J-G. (2008). Optimization of enzymatic degumming process for rapeseed oil. *J Am Oil Chem Soc*, 83 : 653 – 658.
- Yesim Yesiloglu. (2005). Utilization of bentonite as a support material for immobilization *candida rugosa* lipase. *Process Biomistry*. 40: 2155-2159.
- Yu D.; Jiang L.; Li Z.; Shi J.; Xue J.; Kakuda Y. (2012). Immobilization of phospholipase A<sub>1</sub> and its application in soybean oil degumming. *J Am Oil Chem Soc*, 89: 649 – 656.

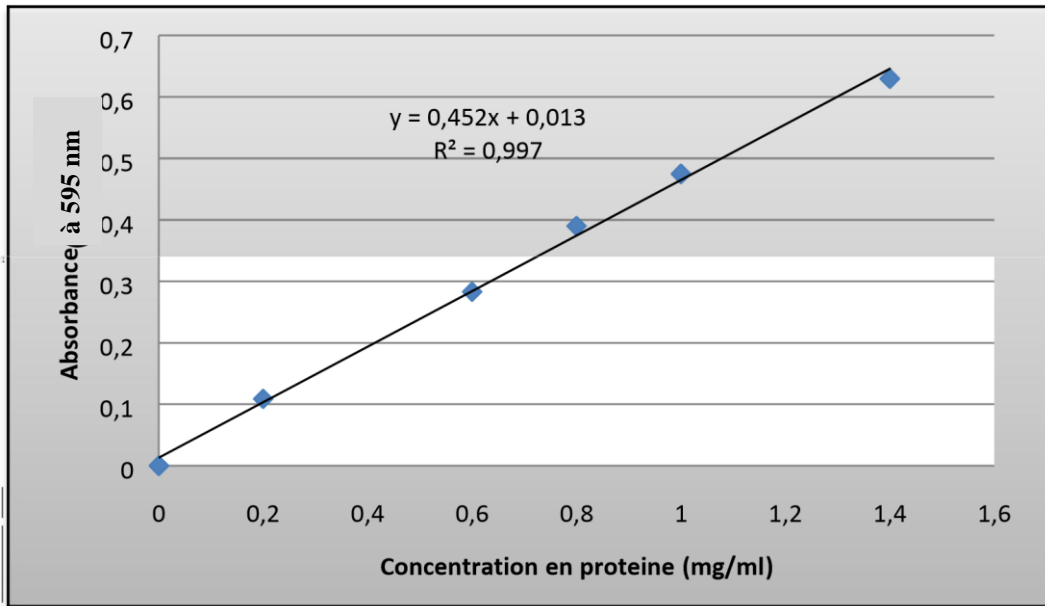
**-Z-**

- Zeng H-Y.; Liao K.-B.; Deng X.; Jiang H.; Zhang F. (2009). Characterization of the lipase immobilized on Mg–Al hydrotalcite for biodiesel. *Process Biochem*, 44: 791 – 798.
- Zhang L.; Zhang S.; Zhao L.; Zhu G.; Yang X.; Gao G.; Cao S. (2008). Resolution of n-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine via free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepecia*. *J Mol Catal B-Enzym*, 38 : 119 – 125.

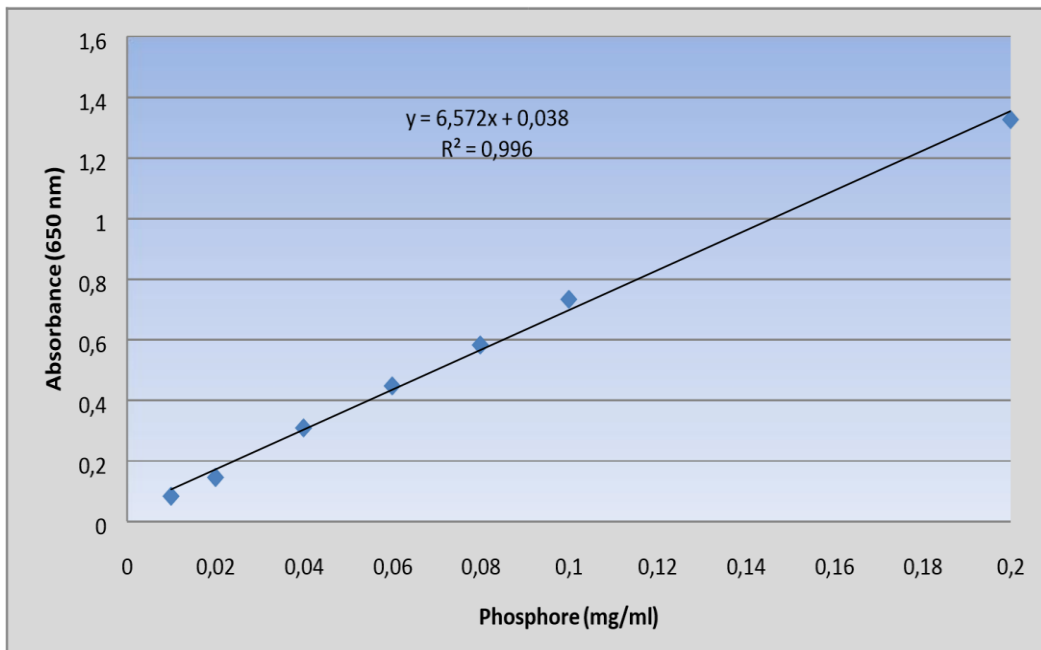


## Annexes

Annexe1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines



Annexe 2 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de phosphore



## **Résumé**

Cette étude représente un essai d'immobilisation de la phospholipase A1 (PLA1) ou lecitase<sup>®</sup> ultra sur la bentonite par la mesure de l'activité lipasique et phospholipasique. Les résultats montrent un optimum d'activité à pH 7 et l'immobilisation sur la bentonite n'avait pas d'effet significatif sur le pH, à un effet notable sur la température. La PLA1 présente une meilleure activité phospholipasique; en présence de la Lécithine comme substrat qu'une lipasique en présence d'huile d'olive. L'immobilisation de la lipase sur la bentonite présente une bonne stabilité puisque l'enzyme maintient une activité significative pendant 4 cycles.

Mots clés : PLA1, activité lipasique, activité phospholipasique, immobilisation, bentonite.

## **Summary**

This study shows an immobilization test of the phospholipase A1 (PLA1) or Lecitase<sup>®</sup> Ultra on bentonite by the measurement of the lipase and phospholipase activity. The results show an optimum activity at pH 7 and immobilization on the bentonite has no significant effect on the pH. The PLA1 has a better phospholipase activity; in the presence of lecithin as substrate than lipase activity in the presence of olive oil. The immobilization of lipase on bentonite has a good stability since the enzyme maintains a significant activity after 4 cycles.

Key words: PLA1, lipase activity, phospholipase activity, immobilization, bentonite.

# Introduction Général

---

## Introduction général

La des huiles est un concept complexe. C'est un domaine en pleine évolution, intégrant la synergie entre la demande de plus en plus forte, les exigences de qualité requise par les consommateurs vis à vis de sa santé humaine et la préservation de l'environnement.

Le procédé de raffinage des huiles alimentaires comprend quatre étapes principales, qui sont : la démucilagination, la neutralisation, la décoloration et la désodorisation. Nous intervenons dans cette étude au niveau de la démucilagination. Au niveau de cette étape, l'huile subit plusieurs traitements afin de le séparer des composants indésirables qui dénature l'huile pendant le stockage (phospholipides non hydratables). La technologie utilise en générale de l'acide phosphorique. C'est le procédé chimique. Il génère de grande quantité d'effluent polluant difficilement valorisable. Récemment, une technologie nouvelle est apparue utilisant des enzymes et appelée dégomme enzymatique. La phospholipase A1 appelé aussi Lecitase® Ultra est une de ces enzymes utilisées par la raffinerie d'huile Cevital de Bejaia. Le dégomme enzymatique est adapté de manière optimale pour les huiles à haute teneur en phospholipides non hydratables (PNH). Ce procédé permet de réduire la teneur en phosphore à moins de 10 ppm, d'améliorer le rendement en huile et d'obtenir moins d'huile dans les gommages (Casado et al, 2008).

Le dégomme enzymatique est donc considéré comme un processus respectueux de l'environnement, en raison de la réduction des déchets polluants au cours du processus de raffinage (Galhardo et Dayton, 2012).

La lecitase® Ultra est une nouvelle lipase microbienne développée par Novozymes sur la base de la technique de clonage des gènes de la lipase de *thermomyces lanuginosus/fusariumoxy sporum* exprimées dans *Aspergillus oryzae* modifié génétiquement (Yang et al, 2006). Elle a une activité inhérente à la fois sur les phospholipides et sur triglycérides et peut être utilisée pour le dégomme des huiles végétales par hydrolyse des PNH (Yang et al, 2008).

Jusqu'à aujourd'hui, la Lecitase® Ultra (PLA<sub>1</sub>) est utilisée sous sa forme soluble. Cependant, pour réduire son coût d'exploitation, sa réutilisation nous paraît primordiale. La réutilisation de l'enzyme exige une forte stabilité et une activité qui doit être suffisamment grande pour permettre sa réutilisation (Spahn et Minter, 2008).

L'immobilisation est une des stratégies qui permet d'élargir le champ d'utilisation de ces enzymes. La biocatalyse à l'aide de Lecitase constitue une alternative aux procédés

## Introduction Général

---

purement chimiques et permet de réduire l'utilisation des solvants. Une meilleure maîtrise de l'utilisation de la Lecitase immobilisées dans ce type de réaction reste à atteindre.

L'immobilisation des enzymes augmente leur valeur économique et permet diverses configurations de réacteur qui empêchent la présence de l'enzyme dans les produits.

Elle sert à améliorer leurs stabilités et prolonger leur demi-vie. Cette dernière a des effets sur l'environnement de l'enzyme en lui permettant de rester actives à différentes température ou pH que l'enzyme non immobilisée ne le permet pas (Tanac et tosa, 1993).

Les méthodes d'immobilisation d'enzymes sont très nombreuses et diverses. Selon l'application envisagée on choisi la méthode la plus appropriée. Les méthodes d'immobilisation peuvent être classées selon la nature des interactions des enzymes avec le support et le substrat (Durand et Monson, 1982).

Parmi les méthodes d'immobilisation, on trouve l'immobilisation par adsorption qui est facile, économique et aussi douce envers l'enzyme. La bentonite est un matériau à faible coût qui a des propriétés absorbantes grâce à sa grande surface spécifique. Elle présente une faible toxicité et une forte réactivité chimique (Yesiloglu, 2005).

Notre travail s'inscrit dans un cadre thématique qui a pour objectif d'immobiliser la Lecitase®Ultra utilisée au niveau de complexe Cevital sur la bentonite et de comparer ses caractéristiques à celle non immobilisée ; c'est-à-dire la PLA1 libre.

Le plan choisi pour élaborer notre étude se résume en une optimisation de quelques paramètres physicochimiques influents sur l'activité lipasique et phospholipasique de l'enzyme libre et celle immobilisée sur la bentonite. Pour évaluer les performances de notre enzyme immobilisée, nous lui avons fait subir un test dans une application dans le dégommeage d'une huile de soja utilisée au niveau de Cevital.