

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Science Biologique
Option : Biotechnologie Microbienne



Réf:.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**OPTIMISATION DES PARAMETRES PHYSICO-
CHIMIQUES DE DEGOMMAGE ENZYMATIQUE
DE L'HUILE DE SOJA**

Présenté par :

SAIGH Amel

Soutenu le : **16 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

M^{me} **ARKOUB .W**

M^r. **BOUKERROUI . A**

M^{me} **LAINCER . F**

MCB

MCA

MAB

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire : 2014 / 2015

REMERCIEMENTS

*Je remercie en premier lieu, Dieu de m'avoir aidé pour
atteindre ce but et de défier tous les obstacles afin d'accomplir ce
modeste mémoire de fin d'étude.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur BOUKEROUI.A. Je le
remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.*

*Je remercie également les membres du jury, la présidente
Madame ARKOUB.W et l'examinatrice Madame
LAINCER.F.*

Je tiens à présenter mes profondes gratitudes à Mr HAJAL.S, et à toute l'équipe

R&D

*Mes remerciements s'adressent aussi à tout le personnel du laboratoire de la
raffinerie des huiles de Cevital ,pour l'accueil, l'aide, et les conseils qui m'ont
apportés tout au long de mon stage.*

*J'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes qui par leurs paroles,
leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont
accepté à me
rencontrer et répondre à mes questions durant mon stage .*

DEDECACES

J'aimerais dédier ce travail A mes très chers parents :

Vous avez comblés ma vie de tendresse, D'affection et de compréhension. Rien au monde Ne pourrait compenser les efforts et les Sacrifices que vous avez consentis pour mon Bien être, et la poursuite de mes études dans De bonnes conditions.

Aucune dédicace, n'exprime à son juste Valeur le profond amour que je vous porte.

Puisse dieu, vous procure santé, bonheur et Longue vie.

A mes adorables frères et sœurs : Jugurtha, Mazigh et Tika, Lina que dieu me les gardes. A mes oncles, tantes paternels et Maternels ainsi que leurs familles.

Je ne vous remercierai jamais assez chères amis « Elyes ,katia ,Lamou, Djadja, Sihem, ... » mes collègues de travaille d'avoir partagé avec moi chagrin et bonheur et pour votre soutien moral et votre amour, merci de n'avoir jamais lâché ma main. Que dieu vous gardent toutes pour moi.

ainsi tout les étudiants de laboratoire GP et à toute la promotion

Microbiologie Appliquée 2015

Sommaire

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Introduction01

CHAPITRE I :Synthèse Bibliographique

I.1 Raffinage des huiles végétales..... 03

I.2 La phospholipases..... 05

I.3 Modélisation..... 08

I.4 Etat de l'art sur l'immobilisation des l'enzymes de pla1.....09

CHAPITRE II: Matériel et méthodes

II.1 Présentation du Complexe CEVITAL spa. Béjaïa..... 12

II.2 Normes et produits chimiques..... 15

II.3 Enzyme..... 15

II.4 Support pour l'immobilisation..... 16

II.5 Immobilisation de l'enzyme..... 16

II.5.1 Protocole d'immobilisation de l'enzyme..... 17

II.5.2 Dosage des proteines 19

II.5.3 Experiences de demucilagination enzymatique..... 20

II.6 Les analyses effectuées.....21

II.7 Modelisation.....24

II.8 Essais au centre.....27

CHAPITRE III : Resultats et discussion

III.1 Caracterisation physico-chimique de la bentonite.....28

III.2 Essai de dégomme de l'huile de soja par PLA1 libre et immobilisée sur la bentonite
.....30

CONCLUSION45

Références bibliographiques

La liste des figures et tableaux

Annexes

Liste des abréviations

rpm: Rotation par minute

HP : Phospholipide hydratable

NHP: Phospholipide Non Hydratable

PLA1 :Phospholipase A1

Ba : Bentonite activée

DRX : Diffraction des rayons X

SPECTROSCOPIE IRTF: Spectriscopie Infrarouge à Transformé de Fourier

Ppm : particule par million mg/ml

FFA: Free Faty Acid

(P) : Phosphore

Introduction

Les huiles végétales brutes subissent plusieurs opérations de procédés physiques ou chimiques au cours de leur raffinage. L'objectif du raffinage est d'éliminer les impuretés telles que les phospholipides, les acides gras libres, les pigments colorés et les produits d'oxydation. Ces opérations permettent à l'huile d'acquérir des propriétés de stabilité vis à vis des oxydant (conservation), de couleur et de saveur acceptable par les consommateurs (Ferrari et *al.*, 1996; Medina et *al.*, 2000). La voie de raffinage physique commence par l'étape de démulagination appelé dégomme. Elle se fait d'abord à la vapeur d'eau pour éliminer les acides gras libre facilement hydrolysables ensuite à l'acide pour éliminer les acides gras libres difficilement hydrolysables. Dans l'étape suivante l'huile subi l'opération de décoloration pour éliminer les colorants faiblement présent dans l'huile tel que la chlorophylle et le carotène. Vient enfin la désodorisation qui est réalisé à haute température ($T > 200$ °C) pour volatiliser tous les résidus nocif à l'huile et ayant échappés aux opérations précédentes. Une condition préalable pour le succès du processus de dégomme est la réduction de la teneur en phosphore qui doit être inférieure à 10 mg / kg. (Yang et *al.*, 2006).

Les procédés de démulagination classiques ont plusieurs lacunes en matière de perte d'huile et de pollution de l'environnement, car ils utilisent dans leur procès, de l'acide citrique ou phosphorique pour éliminer les phosphatiques. Ce qui génèrent des effluents acides ou salés. Par conséquent, la recherche dans le domaine des sciences biotechnologiques a établi un procédés alternatifs plus durables et écologique (Alloue et *al.*, 2008). C'est la substitution des enzymes phospholipase à l'utilisation des acides. Actuellement, une raffinerie (Cevital) sur les deux que compte la ville de Bejaia utilise ce procédé de raffinage enzymatique des huiles.

Le dégomme enzymatique est donc une nouvelle méthode récemment employé qui présente un certain nombre d'avantages par rapport aux traditionnels telles que les rendements plus élevés en huile, moins de consommation d'eau, plus respectueux de l'environnement et un excellent potentiel pour des applications industrielles à grande échelle (Yu et *al.*, 2012). Toutefois quelques inconvénients y persistent, car les paramètres opératoires dans lesquels l'enzyme active pleinement restent en jachère. On note aussi que l'enzyme est actuellement utilisée sous sa forme soluble, ce qui limite sa réutilisation et garantie mal sa stabilité.

Le but de notre étude est double. C'est la synergie entre l'optimisation des paramètres de dégomme ajouté à l'immobilisation qui va nous permettre d'améliorer le rendement et le cout de l'enzyme. D'ailleurs, plusieurs travaux de recherche consacrés à l'immobilisation et à l'optimisation ont inspiré certain auteurs (Ramachandra et *al.*, 2002).

Notre travail est donc basé sur l'optimisation des variables influents sur le dégomme de l'huile en utilisant la technique des plans d'expériences. Notre démarche est résumée en trois étapes essentielles. Une première, durant laquelle le nombre et les niveaux des paramètres à tester sont choisis. Un modèle polynomiale sera proposé et sa validité sera discutée. Une deuxième étape, basée sur le tracé des surfaces de réponses, permettra d'évaluer les effets des différents paramètres sur les performances du procédé. Enfin, en dernière étape, une optimisation et une identification des interactions seront réalisées grâce aux surfaces de réponses.

Chapitre I :
Synthèse
Bibliographique

I. RAFFINAGE DES HUILES VEGETALES:

Les huiles végétales produites à partir de graines oléagineuses de soja, de colza, d'arachide ou de tournesol ne sont comestibles qu'après avoir subie le raffinage. Les diverses étapes du raffinage sont indispensables pour éliminer les substances physiques ou chimiques indésirables contenues dans l'huile (Wang et *al.*, 2014) .

I.1. Les étapes du raffinage :

L'huile brute produite à partir de la graine subit les étapes de raffinage suivantes :

- Démucilagination (dégommage): élimination des gommes et des phospholipides.
- Décoloration: enlever les pigments colorants constitués de chlorophylle et de β - carotène).
- Désodorisation: élimination des odeurs et des produits volatils.

I.1.1.a Dégommage ou démucilagination :

Cette opération consiste à éliminer les composés susceptibles de devenir insolubles par hydratation (phospholipides) ou d'être éliminés avec une phase aqueuse (glycérides, sucres, protéines). L'ensemble de ces produits de nature et formule complexes est souvent désigné sous le nom de gommes d'où le nom de l'étape de dégomme.

L'objectif principal du dégomme est cependant l'élimination des phospholipides (Karleskind, 1992 ; Denise, 1992). Que le procédé utilisé soit physique ou chimique, les trois principes de base du processus de dégomme sont :

- L'élimination des phospholipides par formation de micelles;
- L'élimination des phospholipides non hydratables par le traitement chimique;
- L'hydratation rapide des phospholipides. (Novozymes .2004)

✓ Le dégomme a l'acide :

La technique la plus couramment employée consiste à disperser dans l'huile brute des acides comme les acides phosphorique ou citrique. De façon générale, l'acide phosphorique est largement utilisé, car il se forme une liaison forte entre les groupements phosphates et les ions calcium, fer et magnésium. Il était recommandé en particulier pour le dégomme de l'huile de soja, mais l'acide citrique est une excellente alternative, bien que plus coûteuse mais moins polluante. Actuellement, le dégomme aux acides commence à être abandonné dans les procédés de raffinage chimique qui est de plus en plus remplacé par le dégomme enzymatique. (Gibon et Tirtiaux, 1998).

✓ Le dégomme enzymatique :

Le dégommage enzymatique est une méthode récente utilisée par certain industrie à l'instar de Cevital (Algérie). Cette technique a été initialement développée par Lurgi Enzymax. Sous l'action de la phospholipase (PL), les phospholipides non hydratés sont convertis en lyso-phospholipides de formule complexe et acide gras libres qui sont insolubles dans l'huile (Gibon et Tirtiaux, 1998).

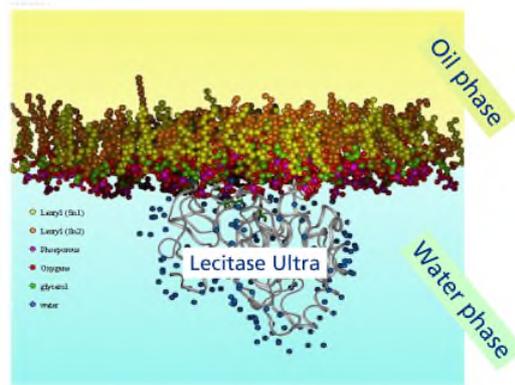


Figure 1: Schéma de la migration micellaire de l'enzyme Lecitase Ultra

I.1.b. Neutralisation :

L'huile brute dégommée subit l'étape de neutralisation pour éliminer les acides gras libérés lors du dégommage. Elle consiste à mélanger l'huile dans une solution de soude qui transforme les acides gras libres en savons (saponification). L'huile subit les différentes étapes suivantes:

- La neutralisation alcaline.
- La séparation.
- Le Lavage.
- Le séchage.

Le passage dans un séchoir permet d'éliminer les traces d'eau qui risquent d'inhiber le phénomène d'absorption lors de l'étape de décoloration (ALLAIN et al .1999).

I.2 LES PHOSPHOLIPIDES:

Il s'agit de composés naturellement présents dans les huiles végétales. Ce sont des composants importants, avec les glycolipides et le cholestérol. Les enzymes phospholipasiques ont amenés à couper les divers liens en phospholipides, savoir les phospholipases (Aloulou.A., 2012). Ils sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée en 1 et 2 par des acides gras et en 3 par un phosphate. Elles peuvent représenter 3 % en poids dans l'huile de soja (Cossut.J., 2001 et Wang *et al.*, 2010) . Les phosphatides peuvent être présents dans l'huile brut sous forme hydratante libre (HP) ou non-hydratable (NHP).

Les phosphatides non-hydratables sont plus difficiles à enlever et devez être transformé par traitement avec un acide concentré (phosphorique ou acétique).

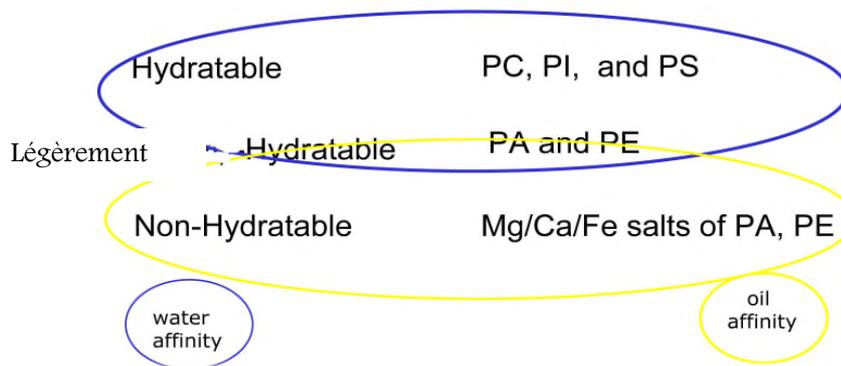


Figure 2 : Les phosphatides hydratante et non-hydratables (Novozymes, 2002 et Yu *et al.*,2013)

- Formes hydratantes (HP):** Ces formes contiennent un groupe fortement polaire, ce sont en particulier la phosphatidylcholine (PC) qui existe dans l'huiles comme un zwitterion et la phosphatidyléthanolamine (PE) qui sont aisément éliminés.
- Formes no-hydratables NHP :** sont présents principalement comme le calcium et / ou sels du magnésium (Ca/Mg), l'acide phosphatidique (PA). (Aloulou.A .2012) et des phosphatidylinositols (PI) existe comme complexe avec le potassium et le magnésium.

Ces phospholipides présentent une hydratabilité différente les une des autres. (SLeeter. R. T.1981).

L'élimination parfaite du phosphore est une opération très importante pour obtenir une bonne qualité de l'huile de soja. (Denise, 1992 et Jamil *et al.* ,2000).

I.2.1. les enzymes:

✓ Définition :

Les enzymes, catalyseurs biologiques des organismes vivants, sont des macromolécules majoritairement de nature protéique et chirale (Dr. Ing. Ernst. 2007 et Vincent M.1996). Les phospholipases sont classifiés dans A1, A2, B, C et D selon la position de la liaison d'ester attaqué. les enzymes sont répandues dans la nature et ils sont d'origine intra et extracellulaire c'est plus avantageux de trouver une phospholipase extracellulaire qui clive efficacement à basse température. (Zhan et al.,2013).

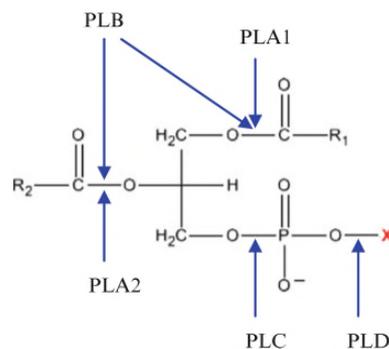


Figure3 : Action de divers phospholipases sur le phospholipide

Où X = base commune de phospholipide (par exemple, choline, éthanolamines, inositol).

Les types A1, A2, B, C, et D sont montrés avec des flèches A. (Aloulou et al.,2012)

L'intérêt de connaître la composition d'une huile est évident, puisque celle-ci va avoir une influence sur sa qualité organoleptique et saveur indésirable surtout les composés phosphorés qui ont une propriété tensio-active et émulsifiante gênant la propriété de raffinage (Karleskind et Denise, 1992)

Au cours des étapes d'un processus industriel, un produit subi plusieurs paramètres variables doivent être optimisés. Certaines de ces variables doivent être maximisées et les autres doivent être réduits au minimum. Dans beaucoup de cas, ces variables deviennent concurrentielles, c.-à-d., l'amélioration d'une variable peut avoir un effet opposé sur une autre et complique plus loin la situation. Plusieurs approches ont été employées pour aborder ce problème.

Une première approche emploie un procédé contraint d'optimisation et en second lieu consiste à superposer les diagrammes de découpe des différentes variables de réponse. La troisième approche est la solution au problème des variables multiples par l'utilisation des méthodologies de surface qui combine toutes les variables dans une mesure. Les avantages d'employer des fonctions de surface incluent ce qui suit:

- (1) Les variables qui ont la graduation différente peuvent être comparés,
- (2) La transformation de différentes variables en une mesure simple et rapide,
- (3) Les réponses qualitatives et quantitatives peuvent être employées toutes les deux.

Avant de commercialiser les huiles raffinées, différents paramètres ont été déterminés: Teneur en phosphore et analyse des acides gras libres. Pour mener à bien le procédé de dégomme des huiles, soit par le traitement physique ou chimique, on doit garantir la très faible présence même à l'état de trace des teneurs en phosphore dans l'huile après le raffinage. Les conditions de réduire la teneur résiduelle en phosphore dans l'huile dépendent de plusieurs paramètres de pH, de température et de durée d'incubation et de rapport enzyme/huile. Le pH est un paramètre dont l'intervalle de variabilité est très réduit (5.5-6). C'est la raison pour la quelle on a gardé celui-ci constant. Et notre choix d'optimisation de ses paramètres a porté sur les quatre variables les plus significatifs.

La présente étude a pour but de trouver les conditions de dégomme d'une huile alimentaire ayant un taux réduit en phosphore et acide gras libre sans oublier notre souci de réduction des couts et d'utilisation abusive d'énergie et des réactif parfois responsable de la pollution de l'environnement.

I.3. MODELISATION :

I.3.1. METHODOLOGIE DES PLANS D'EXPERIENCE :

La méthodologie classiquement utilisée pour étudier l'influence des paramètres opératoires sur une variable d'intérêt consiste à modifier la valeur d'un paramètre tout en maintenant les autres fixes. L'exploitation des résultats et l'étude expérimentale peuvent être fortement simplifiées en utilisant la méthodologie des plans d'expérience. Cette technique permet de créer un modèle statistiquement significatif d'un phénomène qui intègre les interactions entre les variables tout en minimisant le nombre d'essais. (Goupy et Sado et Sado.CH.M., 2000).

I.3.2. Les plans d'expériences fractionnaires

✓ Introduction

Dans un plan factoriel complet, le nombre des essais augmente de façon exponentielle avec le nombre de facteur et devient rapidement peu compatible avec les réalités industrielles. Pour diminuer le nombre d'expériences on peut ne réaliser qu'une partie du plan d'expériences, en gardant les propriétés des plans complets notamment l'orthogonalité. La solution proposée par les plans fractionnaires à deux niveaux et à k paramètres est de réaliser 2^{k-p} . C'est à dire 2^q fois moins d'essais que le plan factoriel complet correspondant (Goupy et Creighton.,2006).

I.3.3. Plan fractionnaire $2^{(4-1)}$

Le but est de rechercher les conditions permettant d'obtenir un allongement maximum à la rupture. On a vu qu'un plan factoriel complet 2^4 nécessite 16 essais pour déterminer 16 coefficients (la moyenne, 4 effets de facteurs, 6 interactions du second ordre, 4 interactions du troisième ordre et l'interaction du quatrième ordre). On souhaite diviser par 2 le nombre d'essais pour qu'on puisse réaliser un plan fractionnaire 2^{4-1} dont la matrice des effets est celle du plan complet 2^3 avec comme générateur d'alias $\mathbf{I} = -123$ (Goupy et Creighton.,2006).

I.3.4. ANALYSE DE REGRESSION SOUS FORME MATRICIELLE:

L'analyse de régression sous forme matricielle est d'un emploi commode pour la résolution des problèmes sur ordinateur. Il s'agit de trouver par la méthode des moindres carrés les coefficients de l'équation de régression suivante :

$$y = f(a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_kx_k) + e$$

Ou : x_0 est une variable fictive égale à 1

L'écriture matricielle permet d'avoir un système d'équations normales destiné à déterminer les coefficients a_0, a_1, a_2, a_k .

$$\sum_{i=1}^N x_{ki} y_i = a_0 \sum_{i=1}^N x_{ki} x_i + a_1 \sum_{i=1}^N x_{ki} x_{1i} + \sum_{i=1}^N x_{ki} x_{1i} + a_k \sum_{i=1}^N x_{ki}^2$$

(Goupy. 2000 et Goupy. 2006)

Le vecteur solution des coefficients A, s'obtient à partir du produit :

$$A = (X^T X)^{-1} \cdot X^T Y \quad ; \quad \text{avec } X^T X: \text{ Matrice des variances}$$

I.3.5. PLAN FACTORIELS COMPLETS A DEUX NIVEAUX:

C'est un modèle composé fractionné 2^{4-1} avec 20 essais dont 04 centrés et 08 en variable étoilées ($-\alpha$ et $+\alpha$)

- **SURFACES DE REPONSE :**

Le présent travail a pour but de fournir les bases nécessaires pour l'utilisation du logiciel *Minitab 16*.

C'est un logiciel statistiques dont lequel une partie est consacrée aux plans d'expériences. Il peut être utilisé pour l'apprentissage de statistiques ainsi que la recherche statistique. Les applications informatiques d'analyse statistique ont l'avantage d'être précis, fiables et généralement plus rapide que le travail à la main. (Rowell et Duffey., 2004).

I.4. ETAT DE L'ART SUR L'IMMOBILISATION DES L'ENZYMES DE PLA1 :

La bentonite activée est un matériau poreux possédant une grande surface spécifique donc d'adsorption (Didi .M.A et al, 2009). Le choix de la bentonite comme support d'immobilisation de l'enzyme réside dans cette capacité d'adsorption élevée dont dispose le matériau, sans négliger cette autre propriété qu'a celui-ci de ne pas dénaturer l'enzyme ce qui permet à cette dernière de conserver son activité. Par ailleurs, différentes méthodes sont employées dans l'immobilisation des enzymes tels que, l'encapsulation, la liaison covalente, la liaison ionique et l'adsorption. Parmi ces méthodes énumérées,, celle qui est la plus simple et la plus facile à employer est l'adsorption (Jesionowski et al ., 2014). Cependant, quelques inconvénients de l'immobilisation par la technique d'adsorption y demeurent et sont liés à sa réutilisation limitée à cause des faibles pertes d'activité provoqué par les lessivages répétitifs du l'enzyme.

NOVOZYMES leader mondial dans le domaine des enzymes, est parmi les premiers à développer un nouveau procédé de raffinage utilisant les phospholipases A1, plus connu sous le nom de Lesitase Ultra au niveau de l'étape de dégomme. Cette opération permet d'éliminer les phospholipides en les transformant en acide gras libres et un composé contenant du phosphore de structure chimique complexe dénommé gommes, d'où l'appellation de dégomme enzymatique et ce, par opposition au raffinage chimique qui lui utilise l'acide phosphorique ou citrique.

Ce procédé a prouvé la pertinence de son utilisation auprès de plusieurs raffineurs d'huiles dans de nombreux pays. En Algérie la seule unité utilisant ce nouveau procédé appartient au groupe Cevital.

La phospholipase A1 composé liquide est utilisé tel quel sans possibilité de réutilisation. De plus une huile normalement dégomme doit contenir une teneur résiduelle en phosphore inférieur à 10 ppm. Pour atteindre ce taux relativement bas en phosphore, plusieurs paramètres physicochimiques doivent être optimisés. Les paramètres les plus influents sont le pH, la quantité d'eau, la quantité d'enzyme, la température et la durée de dégomme.

Pour apporter notre contribution afin de résoudre ces deux problèmes, nous allons à travers la présente étude proposer une optimisation des paramètres cités ci-dessus en utilisant une phospholipase A1 immobilisée sur un support de bentonite.

I.4.1. TRAVAUX ANTERIEURES DE DEGOMMAGE DES HUILES:

le dégomme enzymatique a inspiré Kim Clausen., 2001 dans ses travaux intitulés « Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase ». Ces résultats montrent qu'une application de la phospholipase dans le dégomme de l'huile manifeste un optimum de performances à $\text{pH} \approx 5$ et un intervalle de température 40-50 °C.

D'autres travaux tel que Yang et al., 2006 ont étudié la caractérisation de la Lecitase ultra®, qui est une lipase acide ayant une forte aptitude dans le dégomme de l'huile de colza et de soja.

Plus récemment, les applications de la phospholipase A1 ont intéressé Jiang et Coll., 2014 et 2015. Les travaux publiés en 2014 concernent une étude comparative entre la phospholipase A1 et la phospholipase C et leur effet sur le dégomme de l'huile de soja. Les auteurs concluent à travers cette étude que durant le dégomme, la phospholipase A1 est plus efficace que la phospholipase C dans l'élimination du phosphore. Dans les travaux publiés en 2015, Jiang et Coll ont étudié l'effet d'un prétraitement à l'acide citrique avant l'application de la phospholipase sur des échantillons d'huile de soja à haute teneur en NHP. Grâce à l'effet synergique de l'acide citrique et de la PLA1, les applications pourraient être en conformité avec les caractéristiques spécifiques de l'huile pour rendre le processus plus efficace et plus respectueux de l'environnement.

Plusieurs auteurs se sont penchés sur la technique d'immobilisation pour résoudre le problème de stabilité thermique et de réutilisation de l'enzyme après plusieurs applications. C'est le cas rapporté par les travaux (Sheelu et al., 2008) qui ont présentés un travail sur l'immobilisation de la Lecitase sur une matrice d'hydrogel de gélatine réticulée avec le glutaraldéhyde. Yu et al., 2012 et 2013 ont employés des nanoparticules ferromagnétique pour immobiliser la PLA1 et étudiés leurs applications dans le dégomme de l'huile de soja.

Ce sont les travaux de Huaping Dong et al., 2012 et 2013 qui nous ont inspirés. En effet les deux études portent sur une comparaison des activités de la lipase immobilisée sur la bentonite naturelle, sur la bentonite activée et modifiée par le surfactant. Le travail de (Huaping Dong et al., 2013) indique que Ba dispose d'une grande affinité pour la lipase par des interactions électrostatiques.

Dans notre cas, on a testé la phospholipase immobilisée sur une bentonite activée à l'acide sulfurique et son application dans le dégommeage de l'huile de soja.

I.4.2. LES PLANS D'EXPERIENCE:

Jahani et *al.*, (2008) a employé la méthode de réponse de surface et a pu déterminer les conditions optimale pour le dégommeage enzymatique PLA1 de l'huile de riz . Ils ont utilisé 4 facteurs le temps de réaction, le dosage d'enzymes, niveau de l'eau et la température. Ils ont suivi deux fonctions de réponse ; le taux de phosphore et la teneur en acide gras libre.

Yu et Coll.(2012), ont élaboré un plan d'expérience de Box-Behnken à 04 facteurs. Les paramètres optimum de dégommeage de l'huile de soja sont : la température ; 56 °C, le temps de réaction ; 6.3 h, la masse d'enzyme ; 0.1 g /kilogramme d'huile et la masse d'eau ; 2.13 ml /100 g d'huile. En ces paramètres optimums la teneur en phosphore est réduite à 10.38 ppm.

Pour la construction de notre matrice de variables on s'est inspiré des travaux de Roosta. M et al .,2015 avec quelques modifications. L'analyse de la variance (ANOVA) est réalisée par le logiciel Minitab 16.

Chapitre II :
Matériel et
Méthodes

II.1.Présentation du Complexe CEVITAL spa. Béjaïa :

II.1.a. Implantation :

Le complexe agroalimentaire CEVITAL est le plus grand complexe privé en Algérie, et la première société d'investissement privée dans l'industrie du raffinage des huiles.

Elle est une société par action, d'un montant de 970 000 00 DA. Elle a été créée en 1998 et implantée dans l'enceinte portuaire de Bejaia qui s'étend sur une superficie de 45 000 m², constituée de différentes directions et service.

II.1.b. La raffinerie d'huile :

La raffinerie d'huile du complexe CEVITAL est entièrement automatique, elle est parmi les plus modernes au monde. Elle couvre les besoins nationaux et a permis à l'Algérie de passer du rang d'importateur à celui d'exportateur d'huiles végétales raffinées.

C'est une raffinerie en soft colonne composée de trois chaînes de raffinage A, B et C.

Les deux lignes A et B ont une capacité de plus de 400 tonnes/jours chacune de marque ALFA LAVAL (Suède) et la ligne C de 1000 tonnes/jours, de marque DE SMET (Belgique).

➤ *Les huiles brutes traitées*

Les différentes huiles brutes traitées par CEVITAL sont:

- ✓ **Les huiles fluides:** Nécessitent un raffinage physique et chimique (soja, tournesol, colza, maïs);
- ✓ **Les huiles hydrogénées :** Subissent uniquement un raffinage physique:
 - HBO :** Hydrogen Bean Oil (Huile de graine hydrogénée);
 - HPO :** Hydrogen Palm Oil (Huile de palme hydrogénée);
 - CPO :** Crude Palm Oil (Huile brute de palme);
 - ODF:** Oleïne Doublement Fractionnée;
 - STEARINE :** Huile destinée à la production de la margarine

II.1.c. Huiles produites:

Cevital a lancé plusieurs variétés d'huiles sous différentes appellations commerciales qui sont:

- ✓ FLEURIAL: 100 % tournesol
- ✓ SOYA: 100 % soja.
- ✓ CANOLA: 100 % colza
- ✓ OLIVIA: Huile d'olive raffinée.
- ✓ OLEOL: 60 % tournesol +40 % soja.
- ✓ FRIDOR: Fraction tournesol + ODF selon la saison.
- ✓ ELIO 2: Soja + ODF selon la saison.
- ✓ FLEURIAL PLUS: 100 % tournesol + vitamines A, D et E.

II.1.d. Contrôle de la qualité:

Le complexe CEVITAL compte différents laboratoires qui sont.

1. Deux laboratoires d'analyse des huiles, pour le suivi permanent du procès de raffinage par des analyses physico-chimiques.
2. Un laboratoire d'analyse des margarines
3. Un laboratoire d'analyse du sucre
4. Un laboratoire de microbiologie pour l'analyse du sucre, de la margarine et des produits laitiers entrant dans sa fabrication (crème, lait...).

II.2. NORMES ET PRODUITS CHIMIQUES:

L'huile brute de soja non démulcinée, l'acide citrique, l'enzyme PLA1 et la bentonite activée (Ba) nous ont été donnés à titre gracieux par la société Cevital (Bejaia, Algérie). Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité Recta Pur (RP). Les spectres de DRX de la bentonite avant et après immobilisation ont été obtenus avec un Philips X-Pert analytical, et ceux d'Infrarouge (gamme des nombres d'ondes compris entre 4000-400 cm^{-1}) sur un SHIMADZU, tous deux disponibles au niveau de l'université de Bejaia. Les teneurs en phosphore sont analysées après incinération dans un four à moufle réglé à 600 °C des échantillons d'huile qui sont mis dans des creusets en céramique mélangés à la poudre d'oxyde de zinc,

II.3. ENZYME:

L'enzyme utilisée dans cette étude est une phospholipase A1. Cette enzyme commercialisée sous le nom de LécitaseUltra[®] par Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark) Les propriétés de la LecitaseUltra[®] (PLA1) sont récapitulées dans le tableau I.

Tableau I: caractéristiques de la LecitaseUltra[®] (Yang et al., 2006 ; Novozymes. 2002)

PARAMETRES	PROPRIETES
Spécificité	Phospholipase A1
Forme physique	Liquide
Couleur	Brune
Masse moléculaire / KDa	$\cong 35$
Température	60°C
Température de stockage	0 - 10 °C
Activité déclarée	10 KLU/g
Halal	Oui

II.3.1. La Description de la phospholipase A1:

La phospholipase A1 appelée Lecitase Ultra (EC 3.1.1.3) est une hydrolase d'ester carboxylique est produite par transformation génie génétique de *Thermolyses Lanuginosus* / *Fusarium oxysporum* produite par fermentation submergée d'un micro-organisme *Aspergillus oryzae* génétiquement modifié.

La Lecitase Ultra a une activité inhérente à la fois des structures triglycérides et de phospholipides. L'acte de la phospholipase A1 consiste à donner le lyso-1-phospholipides acide gras, plus libre mentionné par les lettres FFA. Dans les applications pratiques, la

migration d'acyle se traduira par conversion des lyso-phospholipides plus stables. L'utilisation de la phospholipase A2 donne le même résultat .

II.4. SUPPORT POUR L'IMMOBILISATION :

II.4.1. Bentonite

Le support utilisé dans cette étude pour l'immobilisation de la PLA1 est la bentonite activée généralement à l'acide sulfurique et commercialisée par Taïko®Classic. On l'appelle terre décolorante et est utilisée dans la décoloration des huiles végétales. Le support a été utilisé sans aucun traitement complémentaire au niveau du laboratoire.

Tableau II :Compositions minéralogiques et chimiques des terres de blanchissement (sources entreprise).

composants chimiques							
Composé	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	Na ₂ O	K ₂ O	CaO	MgO
Quantité (%)	60.4	17.33	1.19	0.33	0.81	1.6	3.56
composants minéralogiques							
Minéraux argileux (%)				Minéraux non argileux (%)			
Illite	Montmorillonite	Quartz	Gypse	Feldspath	Anhydrite		
%	88	10	Traces	2	traces		

II.5. IMMOBILISATION DE L'ENZYME:

II.5.1. Mesure du pH

Préparation du tampon phosphate (pH 8)

La solution tampon phosphate de pH 8 a été obtenue comme suite :

Préparer une solution de dihydrogène phosphate de sodium (NaH₂PO₄) 0.2M de PM=119.98 g/mol. (Dissoudre 2.399g et ajuster par l'eau distillée dans une fiole de 100 ml).

Préparer une solution dihydrogène phosphate de sodium (Na₂HPO₄) 0.2M de PM=141.96 g/mol.(Dissoudre 2.83g et ajuster par l'eau distillée dans une fiole de 100 ml).

Mélanger les deux solutions préparées (Vml+Vml) selon les proportions suivantes :

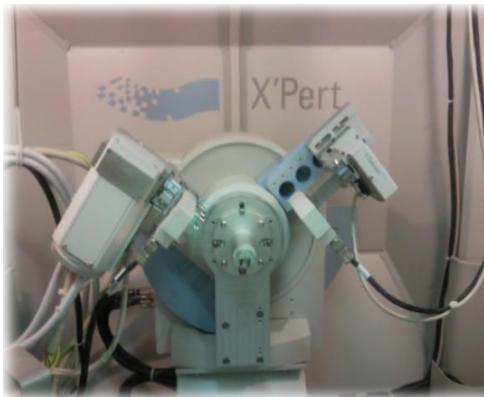
5.3 mlde NaH₂PO₄ 0.2M et94.7 ml de Na₂HPO₄ 0.2M. (Gomori, 1955)

II.6. PROTOCOLE D'IMMOBILISATION DE L'ENZYME:

On mélange sous agitation constante dans un bécher 40 ml de PLA1 et 200 ml du tampon phosphate. Après quelque minute on ajoute 24g de bentonite Ba et on laisse sous agitation constante à 300 rpm à l'air libre et à la température de 40 °C pendant une nuit. Puis on sépare le mélange par centrifugation. On répète 3fois et successivement la centrifugation et les lavages. On laisse sécher pendant quelques jours à la température ambiante et à l'air libre.

II.6.1. CARACTERISATION PAR DRX

La méthode la plus couramment employée et la plus connue pour l'étude de la structure des phases constituant un matériau est la **diffraction de Rayons X** (Copley,2001 , Brundle et al.,1992).



(a)



(b)

Figure 3 : Schéma du diffractomètre rayons X utilisé. (a) à gauche ; photo de l'enceinte où a lieu la diffraction,(b) à droite le porte-échantillon d'acier inoxydable utilisé .

II.6.2. CARACTERISATION PAR SPECTROSCOPIE IRTF:

La spectroscopie IR est essentiellement fondée sur le phénomène de l'absorption de l'énergie lumineuse par la matière. Lorsqu'une molécule absorbe l'énergie fournie par une radiation électromagnétique qui correspond au domaine de l'infrarouge ; celle-ci sera animée de mouvement de vibrations de ses liaisons. Elle passe de son état énergétique fondamental à un état énergétique supérieur, cette absorption se traduit par des bandes caractéristiques de chaque composé indexé dans une fréquence donnée.

✓ *Mode opératoire:*

Les analyses IR des échantillons de bentonite Ba et d'enzyme immobilisé sont obtenus par la technique de broyage et pastillages dans du KBr. Les analyses IR de l'enzyme liquide est

directement lus après introduction de l'enzyme liquide dans une capsule spéciale IR pour liquides.

II.7 DOSAGE DES PROTEINES :

II.7.1. PRINCIPE

L'analyse des protéines avant et après immobilisation est mesurée par la méthode de Bradford en utilisant de l'albumine de sérum bovin (Bradford .M.M, 1976) à la longueur d'onde de 595 nm par spectrophotométrie (UV mini-1240, SHIMADZU) en utilisant le bleu de Coomassie G-250

II.7.2. MATERIELS ET SOLUTIONS UTILISEES:

- Fiole, balance et eau distillée
- Tampon phosphate pH 7 obtenu par mélange de 39ml de NaH_2PO_4 et 61 ml de Na_2HPO_4
- NaCl
- Solution de BSA: dissoudre 0.03g dans 100ml de NaCl
- Solution de BRADFORD: 0.1g de bleu de Comassi + 50 ml éthanol ajuster à 100ml avec l'acide phosphorique et filtrer.

II.7.3. MODE OPERATOIRE :

- ✓ Solution mère de BSA à 0.3mg/ml

Tableau III : Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéine.

BSA (ml)/Enzyme	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Eau distillée (ml)	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3

Ajouter 4 ml de solution BRADFORD rapidement et mélanger par le vortex, laisser à l'obscurité entre 5min et 1h et lire l'absorbance à 595 nm.

- ✓ Pour l'échantillon de l'enzyme

dans une fiole de 100 ml on prend 1 ml d'enzyme on ajoute jusqu'à tris de jauge avec tampon phosphate pH 7 et on réalise une série de dilution avec le même principe ajout solution BRADFORD a la fin lire l'absorbance à 595 nm.

II.8. EXPERIENCES DE DEMUCILAGINATION ENZYMATIQUE:**II.8.1. PRINCIPE:**

Elle consiste à transformer les phospholipides non hydratables en lyso-phospholipides hydrophyles sous l'action d'une phospholipase A1.

II.8.2. Matériels et solutions utilisées:

- Un bécher, une plaque agitatrice, un thermomètre, un bain d'huile et une centrifugeuse.
- solution acide citrique à 45% (45g/ 100 ml) et une solution d'hydroxyde de sodium 0.1M .

Figure 4: Photo de l'expérience de démulcination enzymatique

II.8.3. MODE OPERATOIRE :

Mettre 50ml d'huile de soja brute dans le bécher et chauffer sous agitation constante à 80°C environ. Ajouter 0.3 ml de solution d'acide citrique à 45%. Après homogénéisation pendant 1 min à 10 000 rpm, le mélange a été incubé pendant 20 minutes à 80° C, sous agitation mécanique (600rpm).

Ensuite, la température de l'huile a été réduite à la température souhaitable (40-60° C). ajuster le pH à 5 par quelque ml de NaOH1 N (Buchold et al., 1996).

Après, on ajoute la quantité d'eau (X₁) et d'enzyme (X₂) prévue et la suspension a été mélangé à vitesse élevée (10 000 rpm) pendant 1min. Ensuite, la suspension est incubé dans le bain marie réglé à la température(X₃) sous agitation constante de 600 rpm environ, pendant un temps fixe (X₄).

A la fin de la réaction la suspension est centrifugée et le surnageant d'huile dégommée est récupéré pour le dosage de phosphore et des acides gras libre (FFA).

II.9. LES ANALYSES EFFECTUE

II.9.1. Détermination de l'acidité :

Cette méthode permet la mesure de l'acidité oléique (acide gras libre) d'une huile végétale. Les corps gras sont essentiellement constitués de triglycérides c'est-à-dire qu'ils contiennent dans la même molécule trois fonctions ester. La formation des acides gras libres est obtenue selon la réaction suivante : ISO. 6886. (2006).

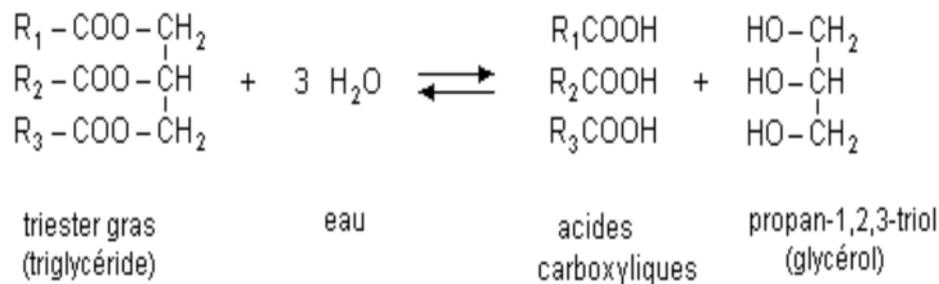


Figure 5 : Réaction de formation des acides gras libres

L'hydrolyse basique des triglycérides à chaud permet de récupérer le triol (glycérol) et le savon. La saponification des triglycérides se déroule selon la réaction suivante :

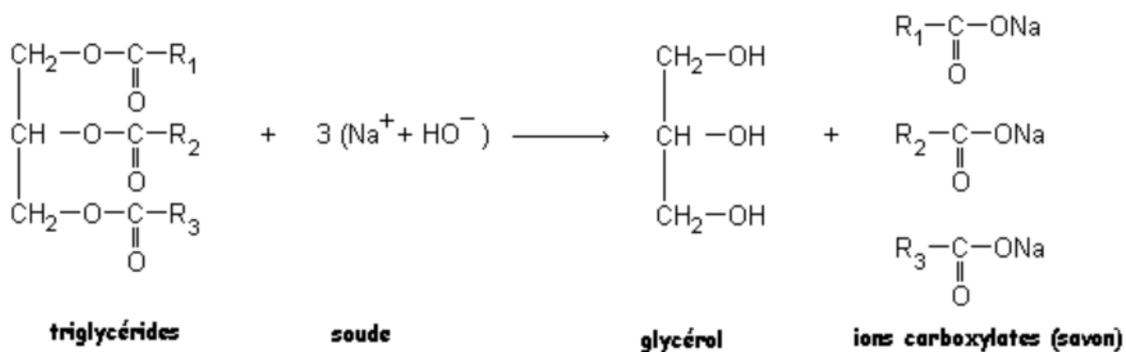


Figure 6 : Réaction de saponification des triglycérides.

II.9.1.3. Mode opératoire :

Préparer dans un erlenmayer une solution de 75 ml d'alcool additionnés de quelques gouttes de phénophtaléine, neutraliser par NaOH 0.1 N jusqu'à apparition d'une coloration rose. Ajouter 10g d'huile à analyser et chauffer dans un bain marie pour y dissoudre la masse d'huile, puis procéder à un deuxième titrage des AGL par NaOH à 0.1N jusqu'à apparition de

la couleur rose persistante et noter la chute de la burette. ISO. 6886. (2006).

Expression des résultats : $ACIDITE = \frac{M \times Nb \times Vb}{P}$ ISO. 6886. (2006).

➤ M : masse molaire d'acide oléique(= 282g/mol)

Nb : normalité de NaOH(=0.1N

P : poids de la prise d'essai (=10g)

Vb : volume de NaOH utilisé pour le titrage (chute de la burette)

Pour exprimer l'acidité en pourcent on applique la formule suivante :

Acidité (%) = 0.282 × V_b ISO. 6886. (2006).

II.9.2.DETERMINATION DES PHOSPHATIDES :

II.9.2.1. Définition et principe:

L'huile et les phosphatides qu'elle contient sont calcinées en présence de l'oxyde de zinc, le phosphore organique est transformé en phosphate de zinc qui est ensuite dosé par la technique spectrophotométrique dans le visible à 650 nm (coloration bleue du phosphomolybdate). C'est la méthode la plus sensible qui convient particulièrement bien au dosage de phosphore dans les huiles raffinées. AOCS. (2009).

II.9.2.2.Equipements et réactifs :

- Creuset en porcelaine
- Four à moufle
- Spectrophotomètre visible
- 1.25 g de molybdate sodium. ajouter 14 ml d'acide sulfurique concentrée et compléter à 50 ml par l'eau distillée.
- Sulfate d'hydrazine en solution à 0.015 % dans l'eau distillée
- HCl concentré
- Oxyde de zinc

II.9.2.3.Mode opératoire:

Peser 3g d'huile dans un creuset en porcelaine , ajouter 0,5g d'oxyde de zinc et calciner à 600°C pendant 2 heures, après refroidissement ajouter 5ml de HCL concentré plus 5ml d'eau distillée, chauffer jusqu'à ébullition, laisser refroidir, filtrer la solution dans une fiole de

100ml, neutraliser par la solution 50 % de KOH, il y aura un précipité qui va se former, ajouter quelques millilitres d'HCL concentré jusqu'à obtention d'une solution limpide et amener à 100ml par l'eau distillée.

Pipeter 10 ml de cette solution dans une fiole de 50 ml, ajouter 8 ml de sulfate d'hydrazine et 2 ml de molybdate de sodium et amener à 50 ml avec l'eau distillée

Mettre au bain marie bouillant pendant 15min, laisser refroidir, faire un essai à blanc exactement dans les mêmes conditions, lire l'absorption à 650nm. AOCS. (2009).

II.9.2.4.Courbe d'étalonnage:

Nous avons tracé la courbe d'étalonnage de la teneur en phosphore à l'aide d'une solution mère (1,0967 g de KH_2PO_4 (Dihydrogénophosphate du potassium) dans 250ml d'eau distillée, cette solution comprend 1mg de phosphore par ml) à partir de cette solution on prélève 5ml dans une fiole de 500 ml et ajuster avec l'eau distillée ; c'est la solution fille, cette solution est à 0,01 mg de phosphore par ml. AOCS. (2009).

➤ Préparation des solutions standards:

Pipeter 1, 2, 4, 6, 8, 10 ml de la solution fille dans des fioles de 50ml, ajouter 8ml de sulfate d'hydrazine et 2ml de molybdate de sodium, amener à 50ml avec de l'eau distillée. Mettre au bain marie bouillant pendant 15mn, laissé refroidir, lire l'absorption à 600nm et tracer la courbe.

➤ Expression des résultats:

Déduire de la courbe d'étalonnage la teneur en phosphore de la solution étudiée puis la teneur en phosphore de l'huile compte tenu du poids d'huile mis en œuvre.

Phosphore (mg/kg) = $10 \times V (A - B)/W$ AOCS. (2009).

Tel que : A : quantité de phosphore de l'échantillon en mg.

B : quantité de phosphore de la solution de l'essai à blanc.

W : quantité de la prise d'essai (mg).

V : volume de la solution final (10ml)

II.10. Modélisation

II.10.1. Logiciel Minitab 16

Avant de mener une analyse statistique, vous pouvez utiliser des graphiques pour étudier les données et évaluer les relations entre les variables. Les graphiques sont également utiles pour synthétiser les informations et faciliter l'interprétation des résultats statistiques.

Le logiciel Minitab fournit les informations suivantes:

- De nombreuses méthodes statistiques organisées par catégories comme la régression, l'ANOVA, les outils de la qualité et les séries chronologiques
- Des graphiques intégrés afin de faciliter la compréhension des données et des résultats validés
- La capacité à afficher et à stocker des statistiques et des mesures de diagnostic (Anonyme, 2010).

II.10.2. PROGRAMMATION DES ESSAIS :

Le nombre d'expérience nécessaire pour établir le modèle est :

Point du plan factoriel: $nf=8$

Point au centre : 4

Points axiaux : 8 ($\alpha =2$ et $\alpha =-2$)

- ✓ Variables centrées réduites

Le passage des variables d'origine A aux variables codées x , et inversement, est donné par la formule suivante (A0 est la valeur centrale en unités courantes) : $x = (A - A_0) / \text{pas}$.

$\text{Pas} = (A_{+1} - A_{-1}) / 2$ (Goupy et Creighton., 2006).

II.10.2.1. Méthodologie de surface de réponse (RSM):

La représentation graphique de l'équations s'appelle surfaces de réponse et permet de décrire l'effet individuel et cumulatif des variables d'essai sur la réponse et de déterminer l'interaction mutuelle entre les variables d'essai et leur effet sur la réponse (Khuri et Cornel, 1987). L'objectif principal de la RSM est de déterminer les conditions opérationnelles optimales pour un système donné qui satisfasse les conditions spécifiques.

Le concept de surface de réponse modélise une variable dépendante Y, dite variable de réponse, en fonction d'un certain nombre de variables indépendantes (facteurs), X_1, X_2, \dots, X_k , permettant d'analyser l'influence et l'interaction de ces dernières sur la réponse. On peut

ainsi écrire le modèle pour une réponse donnée (Y), un modèle polynomial de second ordre.

Les paramètres choisis, dans le cadre de cette étude sont (codés et naturels) :

X₁:Volume d'eau (ml) , X₂ :Masse d'enzyme (g) , X₃ :Températures (°C), X₄ :Temps d'agitation (h) .

Les gammes et les niveaux de ces paramètres sont représentés dans les tableaux IV et V. L'efficacité du dégommage constitue la variable pour deux réponses (taux de phosphore et taux acides gras libre libéré FFA).

Tableau IV : Gammes et niveaux expérimentaux des variables indépendantes d'essais.

facteurs	niveaux			Points étoilés $\alpha= 2.0$		$Pas=(A_{+1}-A_{-1}) /2$
	(A ₋₁) -1	(A ₀) 0	(A ₊₁) +1	- α	+ α	
(X ₁)Volume d'eau (ml)	2	3.5	5	0,5	6,5	1,5
(X ₂) Masse d'enzyme (g)	0.25	0.35	0.45	0.15	0.55	0,1
(X ₃) température T°C	40	52.5	65	27.5	77.5	12,5
(X ₄) temps d'agitation (H)	5h	6,25	7,5h	3.75	8,75	1,25

Tableau V : conception expérimentale D-optimale dans les niveaux codés et les variables réels.

N°	Quantité d'eau (ml) (X1)		d'enzyme (g)(X2)		Température (°C)(X3)		d'incubation (h) (X4)		TENNEUR (P)	FFA
	valeur codé	valeur naturel	valeur codé	valeur naturel	valeur codé	valeur naturel	valeur codé	valeur naturel		
1	-1	2	-1	0,25	-1	40	1	7,5		
2	-1	2	-1	0,25	1	65	-1	5		
3	-1	2	1	0,45	-1	40	-1	5		
4	-1	2	1	0,45	1	65	1	7,5		
5	1	5	-1	0,25	-1	40	-1	5		
6	1	5	-1	0,25	1	65	1	7,5		
7	1	5	1	0,45	-1	40	1	7,5		
8	1	5	1	0,45	1	65	-1	5		
09©	0	3,5	0	0,35	0	52,5	0	6,25		
10©	0	3,5	0	0,35	0	52,5	0	6,25		
11	-2	0,5	0	0,35	0	52,5	0	6,25		
12	2	6,5	0	0,35	0	52,5	0	6,25		
13	0	3,5	-2	0,15	0	52,5	0	6,25		
14	0	3,5	2	0,55	0	52,5	0	6,25		
15	0	3,5	0	0,35	-2	27,5	0	6,25		
16	0	3,5	0	0,35	2	77,5	0	6,25		
17	0	3,5	0	0,35	0	40	-2	3,75		
18	0	3,5	0	0,35	0	65	2	8,75		
19©	0	3,5	0	0,35	0	52,5	0	6,25		
20©	0	3,5	0	0,35	0	52,5	0	6,25		

II.11. ESSAI AU CENTRE

Dans ce cas, la variance des mesures (ou de reproductibilité) est estimée par celle calculée au centre du domaine expérimental :

$$S_{repr}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_0} (y_i - \bar{y}_0)^2}{n_0 - 1}$$

Avec $f = n_0 - 1$ degrés de liberté et \bar{y}_0 étant la moyenne sur les mesures au centre :

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum_{i=1}^{n_0} y_i}{n_0}$$

Dans ce cas, la variance de reproductibilité est indispensable pour estimer la signification des coefficients de l'équation de régression par le test de Student qui consiste à calculer le rapport

$$t_j = \frac{|a_j|}{S_{bj}}$$

Ou :

t_j : suit une loi normale.

a_j Est le $j^{ième}$ coefficient de l'équation de régression.

s_{bj} : Son écart quadratique moyen donné par :

$$s_{bj}^2 = \frac{S_{repr}^2}{N} = s_B^2$$

Si la valeur t_j de Student est plus grande que la valeur $t_\alpha(f)$ tabulée pour le niveau de signification α choisi et le nombre de degrés de liberté f , alors le coefficient b_j est significativement différent de zéro. Les coefficients non significatifs sont exclus de l'équation du modèle.

II.11.1. Validation de modèle (test de Fisher) :**a) Recherche de biais :**

La variation résiduelle estimée est par :

$$s_{res}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_l)^2}{N - l}$$

Est comparée à la variation de reproductibilité.

Avec $N-l$ nombre de degrés de liberté

l : est le nombre de coefficients signification de l'équation de régression

\hat{y}_l : Résultat calculé à partir de Y_i : résultats expérimentaux

Le modèle est considéré « sans biais » si l'inégalité suivante est vérifiée :

$$F: \frac{s_{rés}^2}{s_{repr}^2} < F(0.95, N - l, n_0 - 1)$$

b) Validation de l'équation de régression :

Le test de la validité de l'équation de régression est basé sur la statistique de Fisher.

$$F = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / (l - 1)}{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 / (N - l)} \dots \dots \dots 1$$

Où : \bar{y} est la grandeur moyenne sur toutes les mesures :

$$\bar{y} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \bar{y}_i \dots \dots \dots 2$$

$\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2$: C'est la somme des carrés des écarts résiduels

$\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ C'est la somme des carrés dus à la régression

La somme des carrés des écarts résiduels et des carrés dûs à la régression donne la somme des carrés des écarts totaux

$$\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 + \sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \dots \dots \dots 3$$

$\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2$: La somme des carrés des écarts totaux.

Si le rapport de l'équation (1) est supérieur à la valeur tabulée $F_\alpha(f_1, f_2)$ pour le niveau de signification choisi α et les nombres de degrés de liberté $f_1 = l - 1$ et $f_2 = N - l$, l'équation est adéquate. Le test de Fisher indique de combien est réduite la variance relative à l'équation obtenue en comparaison avec la variance relative moyenne. Plus la valeur de F excède celle de $F_\alpha(f_1, f_2)$, plus l'équation de régression est valide.

II.11.2. Coefficient de détermination (coefficient de corrélation multiple) :

Le coefficient de corrélation R^2 Ou le coefficient de détermination est le rapport entre la variation due à la régression et à la variation totale. Il se calcule comme suit :

$$R^2 = \frac{\text{variation due à la régression}}{\text{variation totale}} \quad (4)$$

Ou d'une façon plus explicite :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\widehat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2} \quad (5)$$

Plus la valeur de coefficient de détermination s'approche de 1 plus notre modèle est représentatif.

Lorsque l'échantillon est d'étendu assez faible, il est nécessaire d'adopter une correction pour l'erreur systématique.

La formule de correction est la suivante : $\overline{R^2} = R^2 - (1 - R^2) \frac{l-1}{N-l}$ (6)

N.B : Pour ceux qui concernent les formules de 1 jusqu'au 6 sont calculées automatiquement par le logiciel minitab 16 donc on a pas besoin des tables pour effectué les testes statistiques appliquées aux plans d'expériences.

Chapitre III :
Résultats et
Discussion

III.1 CARACTERISATION PHYSICO-CHEMIQUE DE LA BENTONITE :

Pour prouver que l'immobilisation de la phospholipase a eu réellement lieu sur le support de bentonite, nous avons utilisé deux techniques de caractérisation disponibles dans notre université à savoir la Diffraction de Rayons X (DRX) et la spectrométrie Infra Rouge (IRTF).

III.1.1. Résultats de DRX:

Les résultats de l'analyse par diffraction des rayons X obtenus sont représentés par les diffractogrammes illustrés par la figure 7.

On observe que la distance interfoliaire qui est identifié par la d_{001} , est visible aux environs de 5° de la position 2θ . La figure 7 montre que la d_{001} liée à l'espace plan est égale à $24,86 \text{ \AA}$ dans la bentonite Ba, mais quand l'enzyme a été immobilisée, l'espace plan augmente jusqu' à $28,86 \text{ \AA}$. Ceci est probablement provoqué par l'intercalation donc par l'immobilisation de l'enzyme phospholipase. Des résultats semblables sont obtenus par certains auteurs (Dong.H et al., 2012 et 2013).

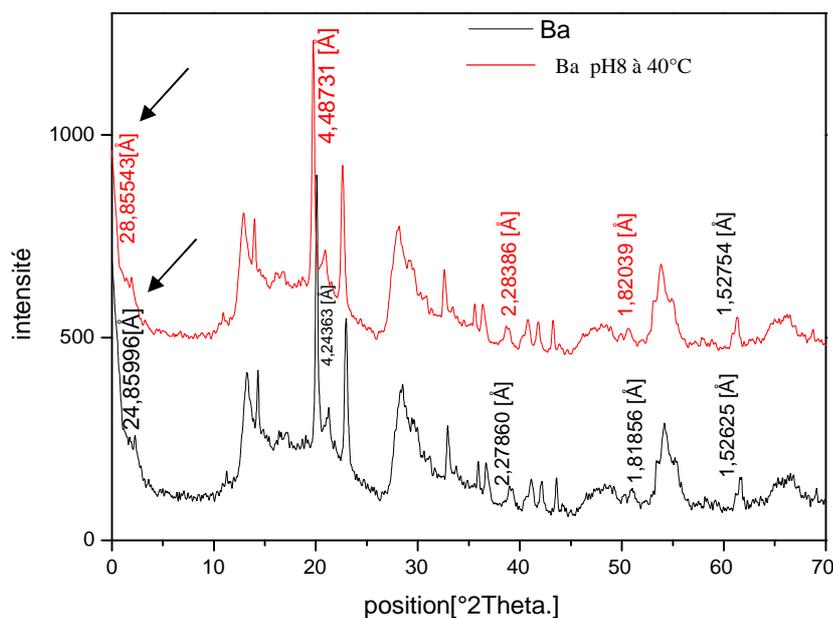


Figure 7: Spectre DRX de la bentonite PLA1 et de PLA1 immobilisée

III.1.2 Résultats de spectroscopie Infra Rouge:

Les résultats de spectroscopie IR sont illustrés par les spectres tracés dans la figure 2. On observe dans les spectres de la figure 2 un pic entre 1600 et 1700 cm^{-1} . C'est la bande de vibration de la liaison de l'amide (Dong et al., 2012). Cette bande est présente dans les spectres de la PLA libre et de la Ba+PLA. Toutefois, sa présence dans le spectre de Ba (OH de l'eau) perturbe légèrement sa visibilité et son interprétation sauf que sa forme est plus rétrécie dans Ba.

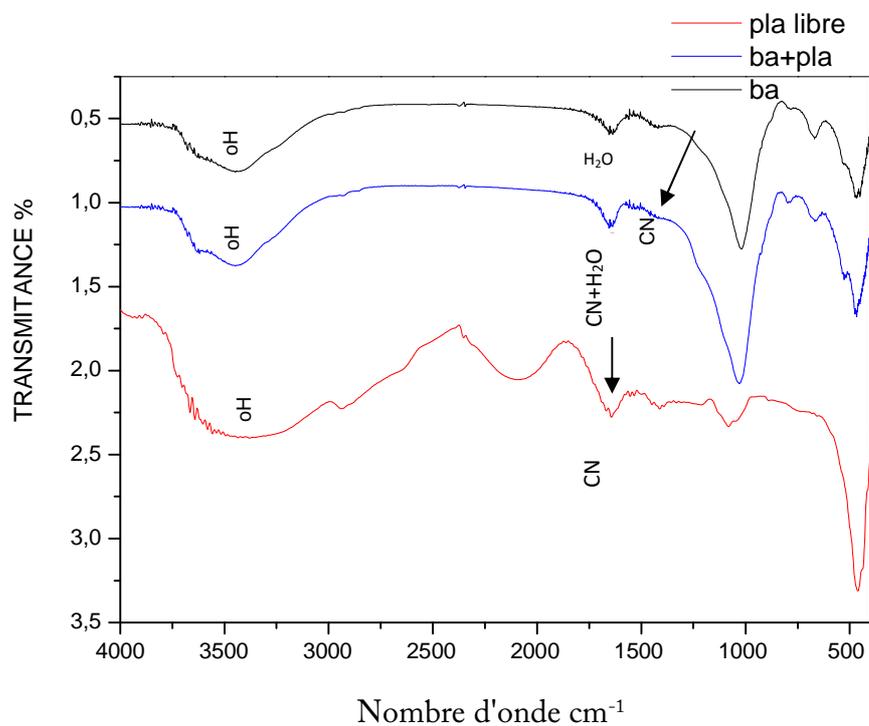


Figure 8 : Spectres IRTF de la bentonite de la PLA1 et de la PLA 1 immobilisée

III.2 Essai de dégomme de l'huile de soja par la PLA1 libre et immobilisée sur la bentonite:

Tableau VI : les résultats d'analyses des phosphore et FFA a partir de la conception expérimentale .

N°	Quantité d'eau (ml) (X1)		Quantité d'enzyme (g)(X2)		Température (°C)(X3)		d'incubation (h) (X4)		Phosphor (ppm)	FFA
	valeur codé	valeur naturel	valeur codé	valeur naturel	valeur codé	valeur naturel	valeur codé	valeur naturel		
1	-1	2	-1	0,25	-1	40	1	7,5	30,63	0,45
2	-1	2	-1	0,25	1	65	-1	5	22,91	0,62
3	-1	2	1	0,45	-1	40	-1	5	100,36	0,99
4	-1	2	1	0,45	1	65	1	7,5	78,50	0,62
5	1	5	-1	0,25	-1	40	-1	5	29,91	0,86
6	1	5	-1	0,25	1	65	1	7,5	87,87	0,68
7	1	5	1	0,45	-1	40	1	7,5	68,88	0,72
8	1	5	1	0,45	1	65	-1	5	35,62	0,66
09©	0	3,5	0	0,35	0	52,5	0	6,25	37,11	0,78
10©	0	3,5	0	0,35	0	52,5	0	6,25	36,84	0,79
11	-2	0,5	0	0,35	0	52,5	0	6,25	6,78	0,90
12	2	6,5	0	0,35	0	52,5	0	6,25	17,41	0,80
13	0	3,5	-2	0,15	0	52,5	0	6,25	30,57	0,58
14	0	3,5	2	0,55	0	52,5	0	6,25	15,59	0,71
15	0	3,5	0	0,35	-2	27,5	0	6,25	25,88	0,68
16	0	3,5	0	0,35	2	77,5	0	6,25	17,60	0,65
17	0	3,5	0	0,35	0	40	-2	3,75	11,09	0,78
18	0	3,5	0	0,35	0	65	2	8,75	63,60	0,65
19©	0	3,5	0	0,35	0	52,5	0	6,25	35,72	0,80
20©	0	3,5	0	0,35	0	52,5	0	6,25	37,06	0,76

L'analyse des résultats du tableau VI montrent que les teneurs en phosphore résiduelle varient entre 6.78 ppm (valeur minimale) et 100.36 ppm (valeur maximale). Les valeurs de teneur en phosphore résiduelle ont diminuée pour chaque variable puisqu'elle était de 215.30 ppm dans l'huile brute. On observe donc que l'enzyme immobilisé sur le support de bentonite a réagit et son action catalytique a permit de réduire la teneur en phosphore présent dans l'huile brute.

On remarque aussi que la teneur minimale de phosphore résiduelle de 6.78 ppm est une valeur inférieure à la norme de 10 ppm. Elle est obtenue avec les variables suivantes : 6.25 h pour le temps d'incubation , 52.5 °C pour la température, 035 g d'enzyme et 0.5 ml d'eau.

Pour les mesures de taux d'acide gras libres (FFA) le même phénomène est observé. C'est-à-dire l'action de l'enzyme sur les valeurs des taux de FFA qui varient de 0.45 à 0.9.

III.2.1.Optimisation des paramètres de phosphore:

III.2.1.1. Réponse Surface Régression: Valeur P; Volume H2O (ml); Enzyme (g); T(°C); T(H) :

Les analyses effectuées par le logiciel sur les résultats de phosphore contenus dans le tableau VI I ci-dessus, a donné les valeurs des coefficients de régression estimés suivantes :

Tableau VII : Coefficients de régressions estimés du modèle pour le phosphore.

Terme	Coefficient	P Valeur	Observations
Constante	-1092,00	-0,000	
H2O ml	114,01	0,000	
Enzyme g	2549,56	0,000	
T°C	-3,31	0,002	
Th	163,66	0,000	
H2O ml*H2O ml	-2,73	0,000	
Enzyme g*Enzyme g	695,47	0, 000	
T°C*T°C	-0,02	0,000	
Th*Th	0,11	0,678	rejeté
H2O ml*Enzyme g	-268,26	0,000	
H2O ml*T°C	-3,11	0,000	
H2O ml*Th	26,18	0,000	
Enzyme g*T°C	47,07	0,000	
Enzyme g*Th	-703,82	0,000	

P_{value} rejeté si $P_{\text{value}} < 0.05$

Avec des valeurs de régressions suivantes :

$R^2 = 99,88 \%$, $R^2(\text{pred}) = 0,00 \%$, $R^2(\text{adj}) = 99,57 \%$

Les valeurs des coefficients de régressions sont estimés acceptable.

A partir de ces résultats on peut suggérer une Equation du model mathématique pour le phosphore :

$$Y_p = -1092 + 114.01x_1 + 2549.56x_2 - 3.31x_3 + 163.66x_4 - 2.73x_1^2 + 659.47x_2^2 - 0.02x_3^2 - 268.26x_1x_2 - 3.11x_1x_3 + 26.18x_1x_4 + 47.07x_2x_3 - 703.82x_2x_4$$

L'ANOVA a donné les résultats suivants :

Tableaux VIII: Analyse de la variance pour le Phosphore.

Source	DL	Seq SS	Adj	SS	Adj	MS	F	P
Regression	13	12567,8	12567,84	966,76	12567.84	966.76	319,93	0.00
Linear	4	3449,9	1545,50	386,37	1545.50	386.37	127,86	0.000
Square	4	3345,3	1707,49	426,87	1707.49	426.87	141.27	0.00
Interaction	5	5772,6	5772,60	1154,52	5772.60	1154.52	382.07	0.00
Erreur Résiduel	5	15,1	15,11	3,02	15.11	3.02		
manque d'ajustement	2	13,8	13,84	6,92	13.84	6.92	16,34	0,024
Erreur pure	3	1,3	1,27	0,42	1.27	0.42		
Total	18	12582,9						

Tableau IX: Analyse des valeurs mesurée, calculé et les résidus.

Obs	P _{mesuré}	P _{calculé}	Residus
1	22,913	22,913	0,000
2	35,625	36,588	-0,963
3	37,108	36,681	0,427
4	30,570	30,570	0,000
5	100,362	98,864	1,498
6	68,880	68,880	0,000
7	25,879	27,377	-1,498
8	15,588	31,121	-15,533
9	17,406	16,443	0,963
10	36,840	36,681	0,159

11	17,600	16,102	1,498
12	35,720	36,681	-0,961
13	11,090	11,626	-0,536
14	6,782	7,745	-0,963
15	37,056	36,681	0,375
16	78,498	79,033	-0,536
17	87,866	89,364	-1,498
18	63,600	63,064	
19	30,629	29,666	0,963
20	29,906	29,371	0,536

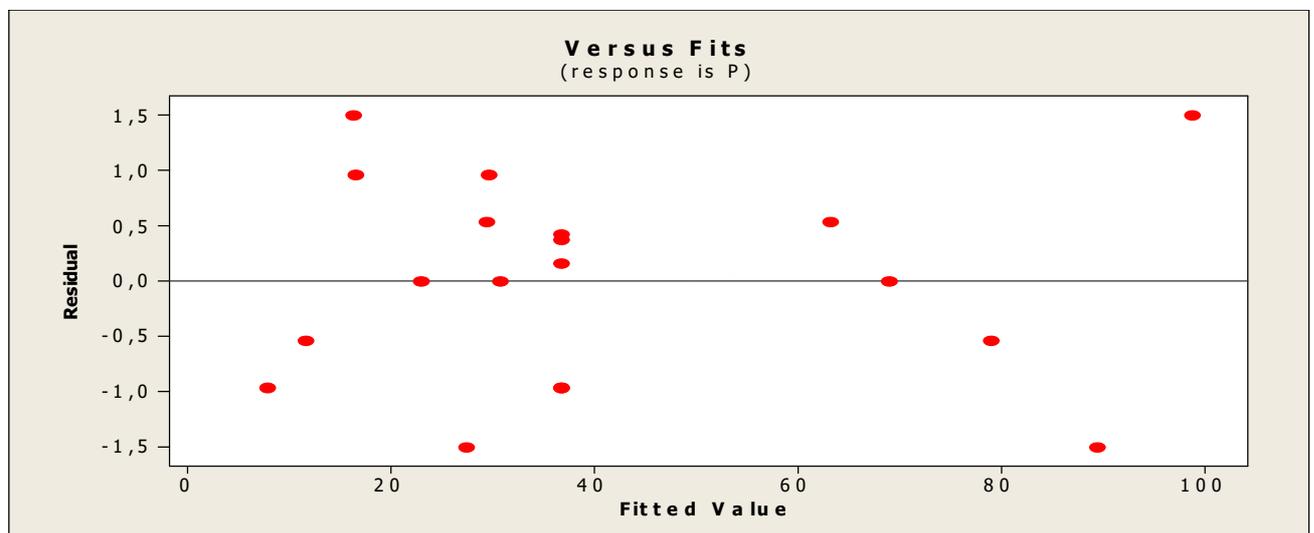


Figure 9 : Courbe de diagramme des Résidus .

Les résultats de points de la figure 9 correspondant au diagramme des résidus montrent que les points sont répartis aléatoirement sur l'ensemble de la surface du domaine. Ce qui nous indique une meilleure adaptation du modèle proposé par le logiciel.

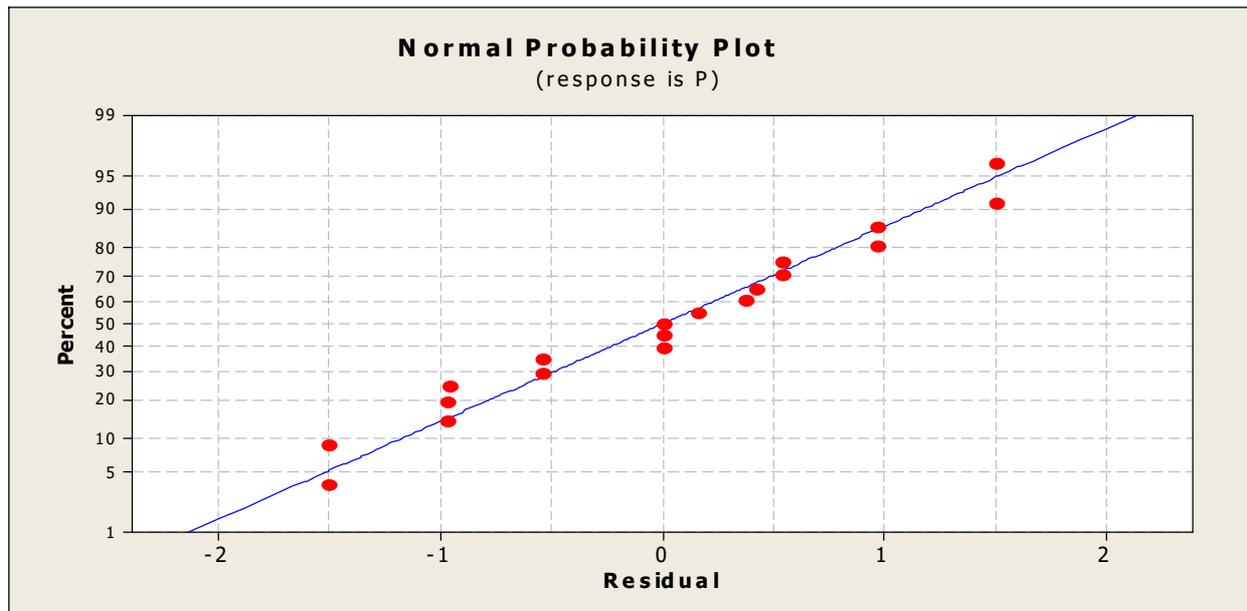


Figure 10 : valeur résiduel de Phosphore .

L'évaluation de la qualité du modèle proposé peut se faire par l'analyse des résidus . Les valeurs de ces derniers regroupées dans le tableau IX, sont tracées en fonction des réponses prédites en figure 10. L'allure du graphe montre une distribution aléatoire des points, ce qui confirme l'inexistence d'une relation entre les réponses prédites et les résidus. Donc le modèle que nous avons établi explique bien les résultats expérimentaux.

De plus la qualité adapté du model polynomial est exprimé par les coefficients de détermination R^2 ($R^2 = 99,88 \%$, R^2 (pred) = 0,00 %, R^2 (adj) = 99,57 %) qui sont des valeurs proche de 1 . Ceux-ci indiquent une bonne adaptation de notre modèle.

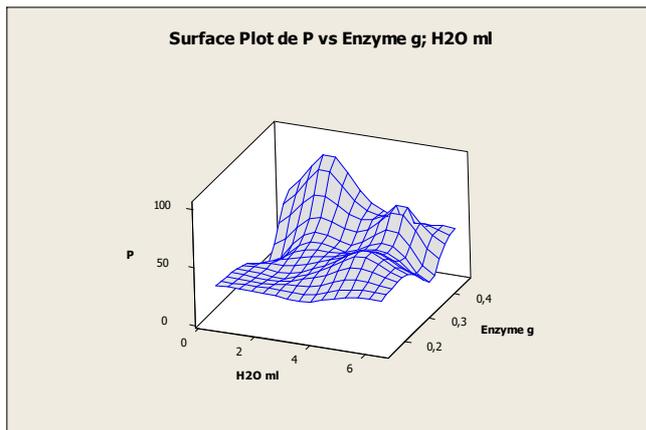


Figure 11: Courbe des Surface de réponse montrant l'effet de la masse d'enzyme (g) , de H₂O (ml) et leurs effet sur la teneur en phosphore .

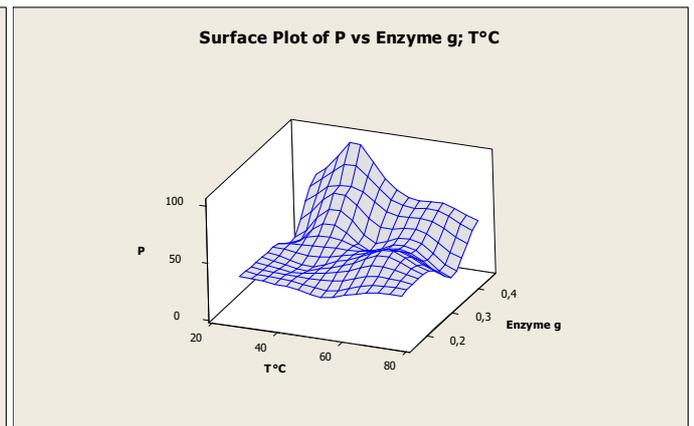


Figure 12: Courbe des Surface de réponse montrant l'effet de la masse d'enzyme (g) , de T (°C) et leurs effet sur la teneur en phosphore .

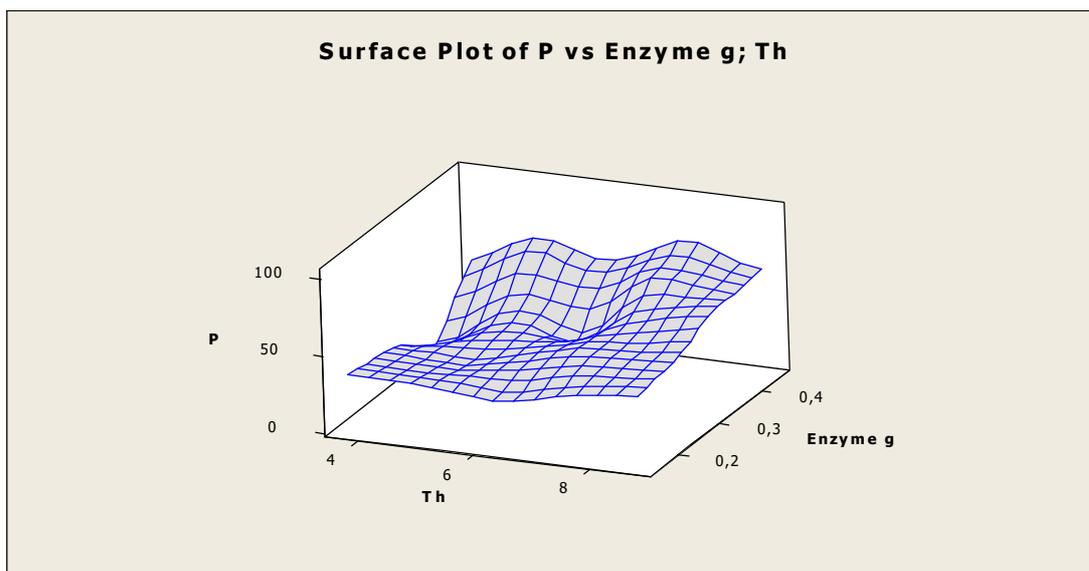


Figure 13: Courbe des Surface de réponse montrant l'effet de la masse d'enzyme (g) , de la durée d'incubation (h) et leurs effet sur la teneur en phosphore.

L'influence des paramètres de quantité d'enzyme, de durée d'incubation , de température et de volume d'eau sur la teneur en phosphore résiduelle contenue dans l'huile est évidente. Ce sont les effets de ses paramètres physicochimiques qui sont interprété par les allures des courbes de surfaces tracées sur les figures 11, 12 et 13 ci-dessus.

La figure 11 montre la courbe de surface de la teneur résiduelle de phosphore comme une fonction du volume de H₂O et de la masse d'enzyme (g). Comme il peut être montré, la variation de P est significatif dans la zone de faible volume d'eau (1.5-2 ml) et de masse d'enzyme comprise entre 0.3 et 0.35 g.

L'allure de la courbe de surface de la figure 12 montrent que la teneur en phosphore résiduelle est faible pour des températures proche de 60 °C et une masse d'enzyme comprises entre 0.35 et 0.4 g

Comme le montre la figure 13, l'influence de la durée d'incubation sur la teneur résiduelle en phosphore ne pourrait être significative qu'entre 0.25 et 0.35 gramme pour des durées d'incubation comprise entre 6 et 8 heures.

Les figures ci-dessous montrent les Courbe de Surface représentant les variations des quantités d'Enzyme et de Température et leurs rapports au Phosphore.

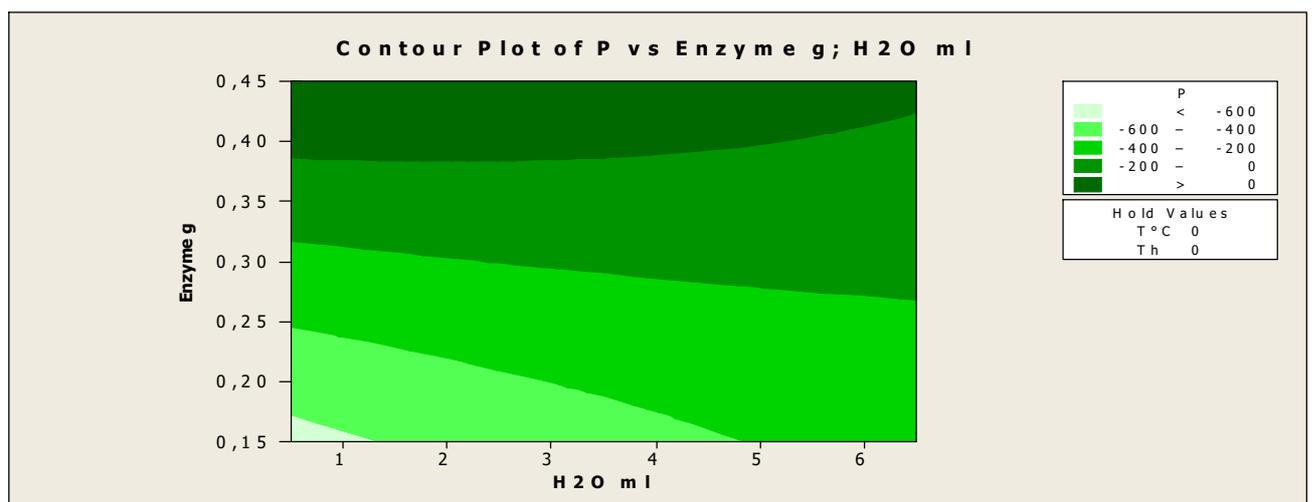


Figure 14 : Graphe de contour de la masse d'enzyme (g) en fonction du volume de H₂O de la teneur résiduelle de phosphore .

Les courbes de surfaces de la figure 14 montrent que les faibles teneurs en phosphore résiduelles (vert clair) est limité dans le domaine de très faibles valeurs de quantité d'enzyme comprise entre 0.15 et 0.18 g pour un intervalle des volume d'eau (0-1 ml) . Donc les variations de quantité d'enzyme en fonction du volume d'eau réduit peu la teneur en phosphore et n'a pas beaucoup d'influence sur la teneur résiduelle de ce dernier.

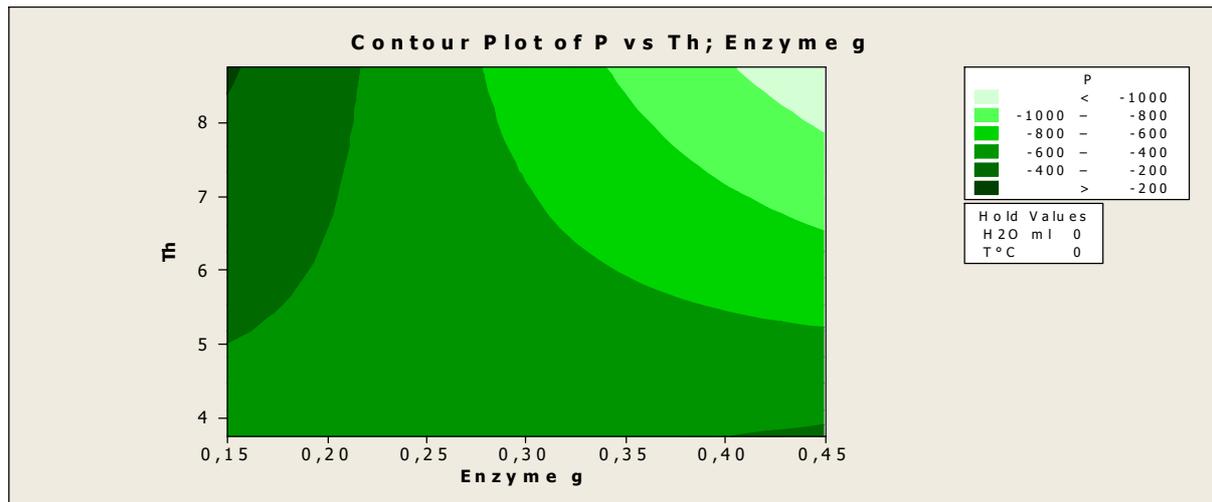


Figure 15 : Graphe de contour de la durée d’incubation en fonction de la masse d’enzyme (g).

Tout comme pour la figure,14, les courbes de surfaces de la figure 15 montrent que les faible teneurs en phosphore résiduelles (vert clair) est limité dans le domaine des valeurs de temps compris entre 8 et 9 h pour des quantité d’enzyme comprise entre 0.4 et 0.45 g.

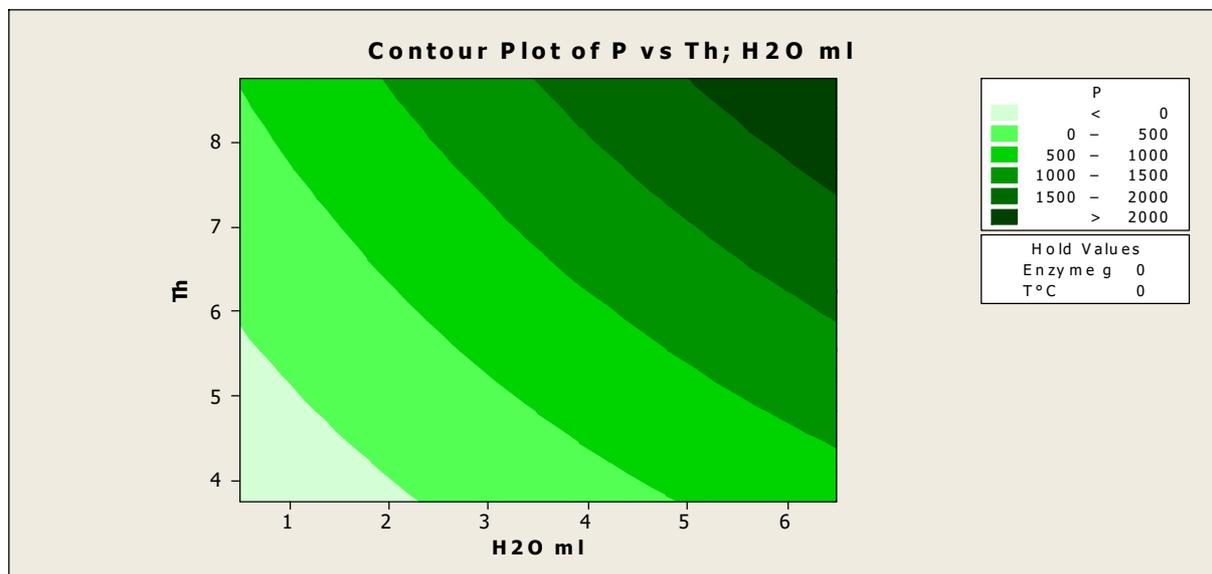


Figure 16: Graphe de contour de la durée d’incubation (h) en fonction du volume (ml) de H₂O.

L’analyse de l’allure des zone de contour de la figure 16, montre que les teneurs faible en phosphore résiduelle (vert clair) est représenté par des durées d’incubation comprises entre 3.5 et 5.75 heures pour des volumes d’eau inferieur à 2.1 ml.

➤ **réponse d'optimisation.**

Solution Global

H₂O (ml) = 2,00679

Enzyme (g) = 0,365508

T (°C) = 50,0001

Temps (h) = 4,23127

➤ **Responses Prédite .**

A partir de l'équation du modèle décrite précédemment et pour les valeurs de volume d'eau de 2.006 ml, une masse d'enzyme de 0.36 g, une température de 50 °C et une durée d'incubation de 4.23 h, on calcule la teneur en phosphore résiduelle que pourrait contenir l'huile brute traitée dans ces conditions fixes. Le calcul donne une valeur de P (ppm) égale à :

Quantité de Phosphore = 9.50000 ppm, Coefficient de régression corrigé= 1,000000

Comme le coefficient de régression est égal à 1, on peut considérer que notre modèle est représentatif.

En conclusion on retient ce que nous a proposé le logiciel, à savoir un volume d'eau de 2.006 ml, une masse d'enzyme immobilisé de 0.365, une température de 50 °C et un temps de 4.23 heures d'incubation.

Ces résultats sont proches de ceux obtenus par certain auteurs ayant travaillé sur le domaine investi par notre étude (Yu et al., 2013) .

III.2.2 Optimisation des paramètres d'élimination des acides gras libres (FFA).

III.2.2.1 Réponse Surface Régression: Valeur P; Volume H₂O (ml); Enzyme (g); T(°C); T(H):

Les analyses sont obtenues à partir des valeurs réelles

Régression Estimée des Coefficients pour FFA

A partir des résultats du tableau X ci-dessus, l'analyse des résultats de FFA par le logiciel a abouti à la proposition des valeurs suivantes pour les paramètres investis :

Tableau X : Coefficients de régressions estimés du modèle pour les acides gras libres (FFA)

Terme	Coef	P valeur	Observations
Constante	-0,77461	0,401	rejeté
H2O ml	0,07087	0,488	rejeté
Enzyme g	6,29938	0,003	
T°C	0,04345	0,001	
Th	-0,15847	0,360	rejeté
H2O ml*H2O ml	0,00776	0,043	rejeté
Enzyme g*Enzyme g	-3,54263	0,003	
T°C*T°C	-0,00019	0,006	rejeté
Th*Th	0,00052	0,961	rejeté
H2O ml*Enzyme g	-0,33412	0,016	rejeté
H2O ml*T°C	-0,00222	0,024	rejeté
H2O ml*Th	0,01547	0,288	rejeté
Enzyme g*T°C	-0,04667	0,036	rejeté

$$R^2 = 98,37\%, R^2(\text{pred}) = 39,31\%, R^2(\text{adj}) = 94,44\%$$

Nonobstant la valeur de R^2 (pred), les deux autres valeurs de R^2 et de R^2 (adj) sont supérieure à 95 %, donc satisfaisantes.

Equation du model mathématique.

$$Y_{\text{FFA}} = 6.299 X_2 + 0.043 X_3 - 3.54 X_2^2$$

On observe que le modèle ne retient que deux variables X2 et X3. Toutes les autres variables (X1 et X4) sont rejetés tout comme les résultats des interactions.

L'ANOVA a donné les résultats suivants :

Tableau XI : Analyse de la variance pour de FFA

Source	DL	SS	Adj SS	Adj MS	F value	P value
Regression	12	0,267949	0,267949	0,022329	25,07	0,001
Linear	4	0,113822	0,074190	0,018548	20,83	0,003
Square	4	0,068977	0,064169	0,016042	18,01	0,004
Interaction	4	0,085150	0,085150	0,021287	23,90	0,002
Erreur Residuelle	5	0,004453	0,004453	0,000891		
Manque d'ajustement	2	0,003413	0,003413	0,001706	4,92	0,113
Erreur pure	3	0,001040	0,001040	0,000347		
Total	17	0,272402				

A l'exception de trois paramètres (DL, valeur de F et de P), le Lack of Fit pour tous les autres est acceptable puisque leurs valeurs respectives sont inférieures à 5%

Tableau XII : Analyse des valeurs mesurée, calculé et les résidus FFA

Obs	Std Order	FFA mesuré	FFA _{cal}	Residues
1	1	0,620	0,620	0,000
2	2	0,663	0,671	-0,008
3	3	0,775	0,783	-0,008
4	4	0,578	0,602	-0,023
5	5	0,987	1,002	-0,015
6	6	0,719	0,719	-0,000
7	7	0,677	0,685	-0,008
8	8	0,705	0,681	0,023
9	9	0,804	0,819	-0,015
10	10	0,792	0,783	0,009
11	11	0,649	0,640	0,008
12	12	0,804	0,783	0,020
13	13	0,775	0,843	
14	14	0,902	0,887	0,015
15	15	0,761	0,783	-0,022
16	16	0,620	0,644	-0,023
17	17	0,677	0,662	0,015
18	18	0,649	0,581	
19	19	0,451	0,443	0,008
20	20	0,860	0,837	0,024

Nous avons limité les valeurs des paramètres entre 0.45 et 0.1, valeurs qui nous paraissent limitative pour notre modèle de calcul de FFA. L'objectif est d'assigner à FFA 72 % de réponse favorables.

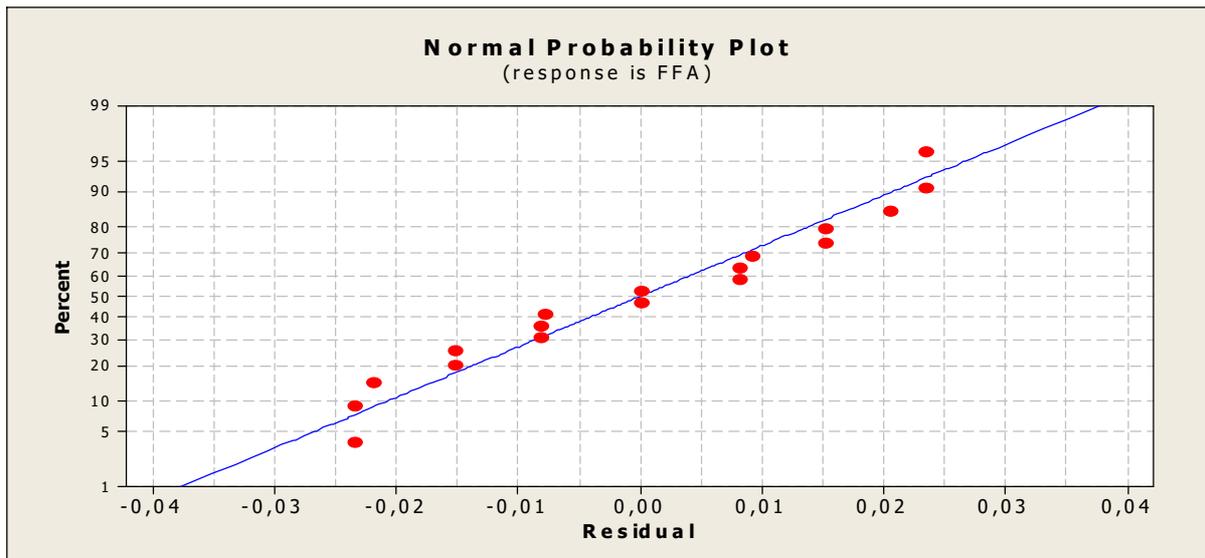


Figure 17 : Courbe de Répartition des Résidus FFA.

Les points de la figure 17 (point rouges) sont en parfaite adéquation avec le modèle proposé car ils sont tous proche de la droite tracé en bleu.

De plus les valeur calculées de coefficient corrigé qui est de 1 nous indiquent que les valeurs de désirabilités sont acceptables à plus de 95 % . Ce qui confirme l’adaptation du modèle proposé au calcule des teneur de FFA.

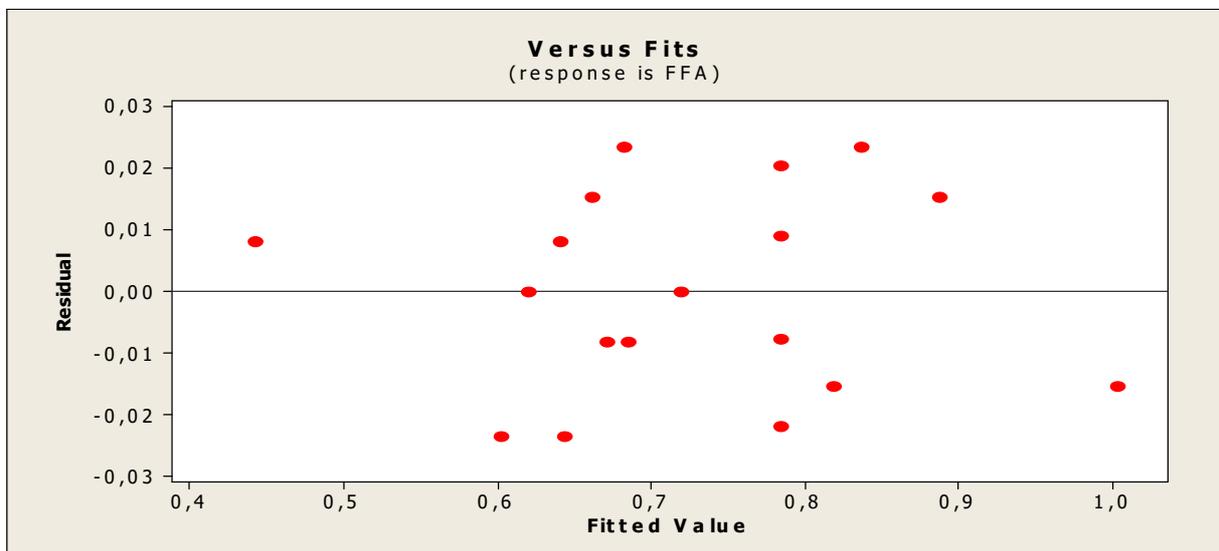


Figure 18 : valeur résiduel de FFA

Le diagramme de la figure 18 montre qu’il n’y a aucune relation entre les valeurs estimés et les résidus, puisque les points sont dispersés aléatoirement. Donc notre modèle est acceptable

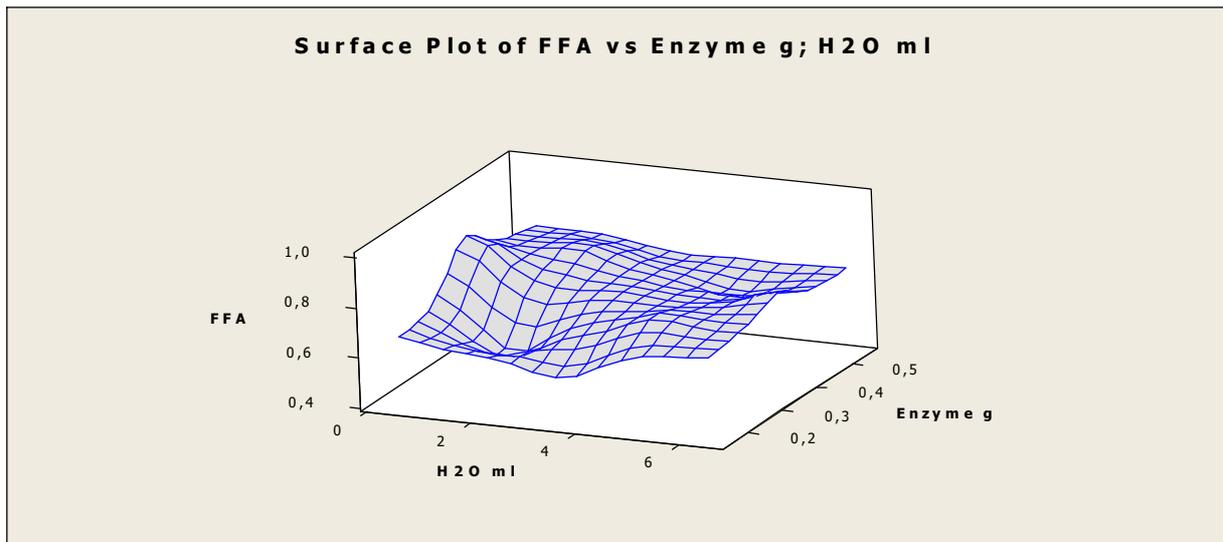


Figure 19: Surface Plot de FFA ,Enzyme et H₂O.

Les résultats de la figure 21 montrent que les faibles valeurs de FFA sont mieux décrites par des valeurs bordure du graphique, c'est-à-dire des volumes d'eau de 4 ml et des quantités d'enzymes comprise dans tout l'intervalle (0.2-0.5 g).

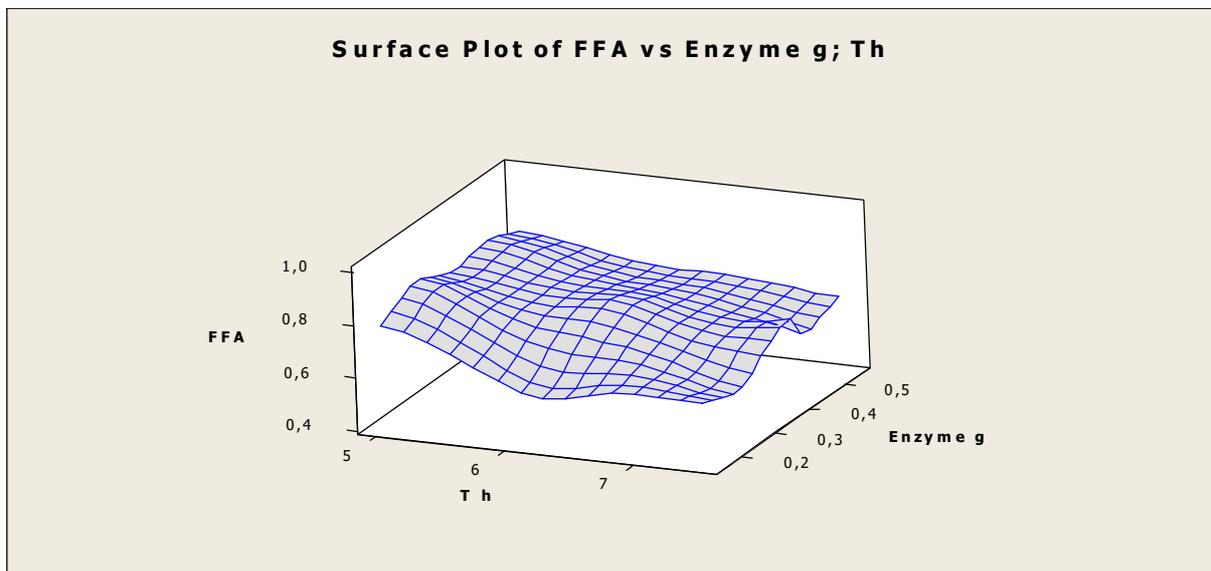


Figure 20 : Surface plot de FFA, Enzyme et T h

Les résultats de la figure 20 montrent que les faibles valeurs de FFA sont données par des temps de d'incubation supérieur à 6 h et des quantités d'enzymes comprise dans les intervalles (0.2-0.5 g).

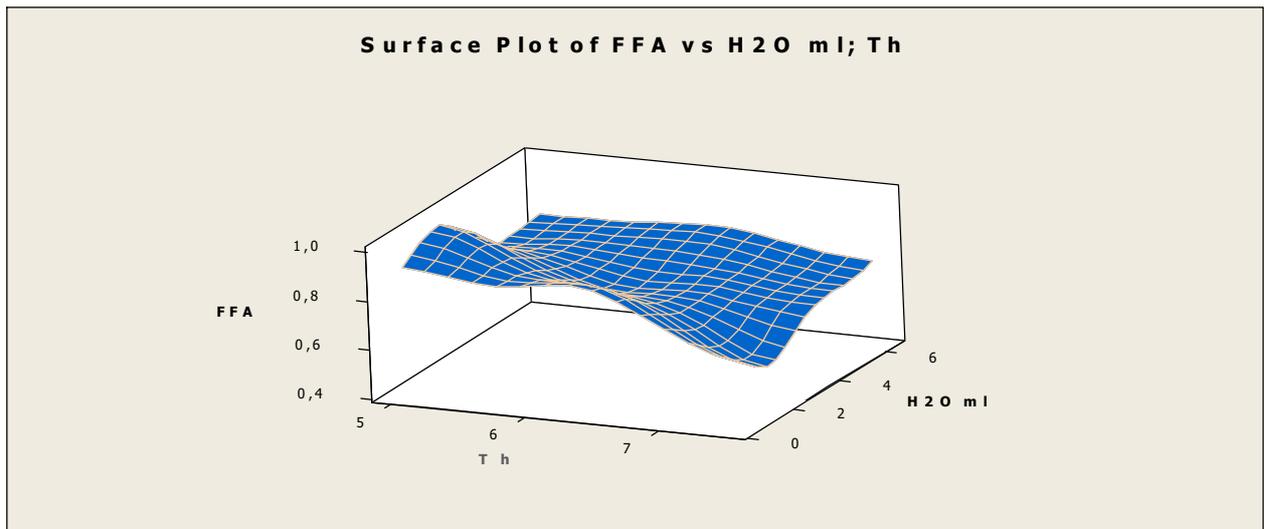


Figure 21: Surface plot de FFA ,H₂O et T h

Les résultats de la figure 21 montrent que les faibles valeurs de FFA sont données par des temps de d'incubation supérieur à 7 h pour des volumes d'eau compris dans les intervalle (02-6 ml).

Les réponses préconisé par le modèle sur les variables et qui est la solution globale à notre optimisation sont les suivantes:

➤ **Réponse d'optimisation**

Volume de H₂O (ml) = 6,49538

Masse de l'Enzyme (g) =0,424325

T (°C) = 63,9690

Temps (h) = 3,75

On remarque que les valeurs données par le modèle sont toutes situées dans l'intervalle des valeurs fixées au départ.

➤ **Responses Predite .**

Pour ces valeurs fixes la réponse prédite sur le taux d'acide gras libre est :

FFA = 0,990000 , Coefficient de régression corrigé = 1,000000

donc notre modèle est représentative.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de ce travail était d'optimiser les paramètres physico-chimiques de dégomme d'une huile de Soja par une phospholipase A1 immobilisée sur un support de bentonite activée en utilisant la modélisation des paramètres par la mise en place d'un plan d'expérience fractionné 2^{4-1} . La résolution du modèle mathématique a été exécuté sur Minitab16.

Les différentes méthodes de caractérisation (DRX et IRTF) qui ont été appliquées sur la bentonite activée et immobilisée, ont permis d'élucider les changements, dans la composition minéralogique induit par le phénomène d'immobilisation .

A la lumière des résultats obtenus, pendant notre étude, les analyses de protéines contenues dans la phospholipase A1 donnent une teneur de 8.75 mg/ml, valeur acceptable que peut contenir ce genre de phospholipase.

Les résultats de modélisation après élaboration d'une matrice de plan d'expériences nous a permis d'optimiser les paramètres de concentration en enzyme, de teneur en eau, de température et de durée d'incubation. La fonction de modélisation obtenue a donné les valeurs des paramètres optimums suivant température; 50 °C, concentration initiale; 0.365 g/ml, durée d'incubation; 4.23 h et un pourcentage d'eau de 1%. Ces variables optimales nous a données une huile contenant une teneur résiduelle en phosphore de 6.78 ppm. Cette teneur en phosphore résiduelle est inférieure à 10 ppm.

On a constaté que la démarche est plus efficace que celles habituelles de conduite des essais. Par ailleurs, la méthode des plans d'expériences apporte à l'expérimentateur un puissant outil de réflexion et d'analyse qui lui permettra de mener son expérimentation avec sûreté et précision

*Références
Bibliographiques*

Références bibliographiques

A

1. Allain E, Comeaux L, Gorlier P, Lemarchand S, Strat P, Merlot M, et Najman R. (1999). Ecole nationale supérieure de chimie de RENNES. Pp 10-20.
2. Aloulou A, Ben A Y, Bezzine S, Gargouri Y et Gelb MH. (2012). Lipases and Phospholipases. Chapitre 4: An Overview Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 861. Pp 63-68.
3. Anonyme .(2010). Introduction à miniTab. Version 16.1.0. Pp 4-52.
[www.minitab.com / uploaded Files/.../ meet-minitab /FR16_MeetMinitab.pdf](http://www.minitab.com/uploadedFiles/.../meet-minitab/FR16_MeetMinitab.pdf)
.consulté le 05/06/2015.
4. AOCS. (2009). In D. Firestone (Ed.), Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (5th ed.). Champaign, USA. Press.

B

5. Buchold. H, Boensch R, et Schroepel J .(1996). Process for enzymatically degumming vegetable oil 5 , Pp 558-781.
6. Bradford M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantization of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry. 72, pp 248–254.

C

7. Carrín M E et Carelli A A. (2010). Changes in quality and composition of sunflower oil during processing and storage. In MC. Tomas (Ed.), Advances in Fats and Oils. Pp. 25-48.
8. COSSUT J., DEFRENNE B., DESMEDT C., FERROUL S., GARNET S., ROELSTRAETE L., VANUXEEM M., VIDAL D., HUMBERT S. (2002). Les Corps Gras : Entre Tradition et Modernité. Projet réalisé dans le cadre du DESS QUALIMAPA (Gestion de la Qualité Nutritionnelle et Marketing des Produits Alimentaires). Institut Agro-Alimentaire de Lille, Université des Sciences et Technologies de Lille, Institut d'Administration des Entreprises de Lille. Pp: 21-64.

D

9. Didi M A., Makhoukhi, Azzouz B A et Villemin D. (2009). Colza oil bleaching through optimized acid Activation of Bentonite. A Comparative Study. Applied Clay Science. 42 .Pp 336-344.
10. Denise J. (1992). Raffinage des corps gras. Manuel des corps gras. Volume 2. Ed. Tec et Doc Lavoisier, Pp. 789-881.

Références bibliographiques

11. Dr Ing Ernst W.munch. (2007). Enzymatic degumming processes for oils from soya, rape and sun.lip pro consulting.Pp 3-35.
12. Dong H, Li j, Li Y, Hu L, Luo D. (2012). Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite. Chemical Engineering Journal **181– 182**.Pp 590– 596.
13. Dong. H, Yimin. L, Guodong S et Liujiang H.(2013). The study on effective immobilization of lipase on functionalized bentonites and their properties. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **95**, Pp 9– 15.

F

14. Falahati M, Mamani L, Saboury A A, Shafiee A, Foroumadi A et Badiei AR. (2011). Aminopropyl-functionalized cubic Ia3d mesoporous silica nanoparticle as an efficient support for immobilization of superoxide dismutase, BBA-Proteins Proteom. 35. Pp1195–1202.
15. Ferrari R A, Schulte E, Esteves W, Brühl L, Mukherjee KD. (1996). Minor constituents of vegetable oils during industrial processing. J. Am. Oil Chem. Soc. **73**, Pp 587– 588.
16. Fernandez L, Palomo J M, Guisan J M, Fernandez L R. (2007). Effect of the immobilization protocol in the activity, stability, and enantioselectivity of Lecitase® Ultra, J. Mol. Catal. B Enzym. **47**, Pp99–104.

J

17. Jahani M, Alizadeh M, Pirozifard M, Qudsevali A.(2008). Optimization of enzymatic degumming process for rice bran oil using response surface methodology. LWT - Food Science and Technology .**41**, Pp1892-1898.
18. Jamil S, Dufour J-P G, Deffense E -M J.(2000) Process for degumming a fatty substance and fatty substance thus obtained. Numéro de publication US6015915 A p 1-7
19. Jesionowski T, Krajewska B et Zdarta J. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: a review. **20**, Pp801–821.
20. Jiang X, Chang M, Jin Q et Wang X. (2015). Application of phospholipase A1 and phospholipase C in the degumming process of different kinds of crude oils. Process Biochemistry.**50**, Pp 432–437.
21. Jiang. X, Chang. M, Wang. M, ,Jin.Q et Wang. X . (2014). The effect of ultrasound on enzymatic degumming process of rapeseed oil by the use of phospholipase A1. Ultrasonics Sonochemistry **21**, Pp 142–148.

Références bibliographiques

I

22. ISO. 6886. (2006). Corps gras d'origines animale et végétale – Détermination de la stabilité à l'oxydation (essai d'oxydation accélérée). Deuxième édition : 1-14.

G

23. Gibon V et Tirtiaux A. (1998). Un raffinage S.O.F.T. Oléagineux, corps gras, lipides. **5**, Pp 371-377.
24. Gopinath S, Sugunan S. (2007). Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity, Appl. Clay Sci. 35 Pp 67–75
25. Goupy J. (1990). Revue de statistique appliquée: Tome **38**. pp. 5-44.
26. Goupy J et Creighton L. (2006). Introduction aux plans d'expériences. 3^{ème} Edition: Dunod. ISBN 2 10 049744 8

K

27. . Kafarov V. (1974). Méthodes cybernétiques et technologie chimique. Ed Mir, Moscou.
28. Karleskind A. (1992). Manuel des corps gras. T1. Edition : Lavoisier. Paris. Pp. 21-768.
29. Khuri AI et Cornel JA. (1987). Response Surfaces Design and Analysis. Edition: Marcel Dekker. New York.USA.
30. Kim .C (2001) Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **103**, Pp. 333–340
31. Lamas D L, Crapiste G H, et Constenla D T. (2014). Changes in quality and composition of sunflower oil during enzymatic degumming process. LWT - Food Science and Technology. **58**, Pp 71-76.
32. Liu N, Fu M, Wang Y, Zhao Q, Sun W et Zhao M. (2012). Immobilization of Lecitase® Ultra onto a Novel Polystyrene DA-201 Resin. Characterization and Biochemical Properties. Appl Biochem Biotechnol. **168**, Pp 1108–1120.

M

Références bibliographiques

33. Medina-Juarez LA, Gamez MN, Ortega GJ, Noriega RJA, Angulo GO. 2000. Trans fatty acid composition and tocopherol content in vegetable oils produced in Mexico. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, Pp 721–724.
34. Myers R H. et Montgomery. D. C. (2002). *Response Surface Methodology*, 2nd Edition: Wiley Sons. New York, USA.

N

35. Novozymes. (2002). Lecitase Ultra. Product Sheet. *Oils & Fats*. 03, 1-3.
36. Novozymes. (2004). Enzymatic degumming/refining of vegetable oil. Discover the industrial evolution in oils and fats. 1-43.

O

37. Ozil P, (1997). plans d'expériences, DO. Polycoché E.N.S d'électrochimie et d'électrometallurgie; INP de Grenoble France.

R

38. Ramachandra V M, Bhat J et Muniswaran P K A. (2002). Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7, pp 57-66.
39. Roosta M, Ghaedi M, Sahrei R et Purkait M K. (2015). Ultrasonic assisted removal of sunset yellow from aqueous solution by zinc hydroxide nanoparticle loaded activated carbon: Optimized experimental design. *Materiel Science and Engineering C* 52; pp 82-89.
40. Rowell. G H et Duffey. M, 2004. Introduction to Minitab OVERVIEW. Student Version 12 and Professional Version 13. Pp 1-8.

S

41. Sado. G et Sado C H. M. (2000). Plans d'expérience à l'assurance de qualité ; Edition : AFNOR Paris
42. Sheelu G, Kavitha G et Fadnavis N W. (2008). Efficient Immobilization of Lecitase in Gelatin Hydrogel and Degumming of Rice Bran Oil Using a Spinning Basket Reactor. *J Am Oil Chem Soc* 85, Pp 739–748
43. Sleeter RT. (1981). Effects of processing on quality of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists*, 58, Pp 239-247.

T

Références bibliographiques

44. Tutar H, Yilmaz E, Pehlivan E, Yilmaz M. (2009). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum*. *Int. J. Biol. Macromol.* **45**, pp 315–320.

V

45. Vincent M, (1996). Blood glucose. Its measurement and clinical importance. *Clinica Chimica Acta* 251 pp 3-17.

W

46. Wang Y, Zhao M, Song K, Wang L, Han X, Tang S et Wang Y. (2010). Separation of diacylglycerols from enzymatically hydrolyzed soybean oil by molecular distillation *Separation and Purification Technology* **75** 114–120

Y

47. Yang J G, Wang Y H, Yang B, Mainda G et Guo Y. (2006). Degumming of Vegetable Oil by a New Microbial Lipase. *Food Technol. Biotechnol.* **44**, pp 101-104
48. Yu D, Jiang L, Li Z, Shi J, Xue J et Kakuda Y. (2012). Immobilization of Phospholipase A1 and its Application in Soybean Oil Degumming. *J Am Oil Chem Soc.* **89**, pp 649–656.
49. Yu D, Ma Y, Jiang L, Elfalleh W, Shi M et Hu L. (2013). Optimization of magnetic immobilized phospholipase A1 degumming process for soybean oil using response surface methodology. *Eur Food Res Technol.* **237**, Pp 811–817.
50. Yu D, Ma Y, Xue SJ, Jiang L et Shi J. (2013). Characterization of immobilized phospholipase A1 on magnetic nanoparticles for oil degumming application. *LWT - Food Science and Technology* **50**, Pp 519-525

Z

51. Zhan J, Jiang S, Pan L et Zhang Y. (2013). Purification, Characterization and Application of a Cold- Adapted Phospholipase A1 from *Bacillus Cereus* Sp. AF-1. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.*

Liste des figures

Figure 1: Schéma de la migration micellaire de l'enzyme Lecitase Ultra.....	04
Figure 2: Action de divers phospholipases sur le phospholipide.....	05
Figure 3: Action de divers phospholipases sur le phospholipide.....	06
Figure 3: Le diffractomètre rayons X (XPhilips X'PERT PAN analytical , Almelo, the Netherlands).....	16
Figure 4: Photo de l'expérience de démulcination enzymatique.....	18
Figure 5 :Réaction de formation des acides gras libres.....	19
Figure 6 : Réaction de saponification des triglycérides.....	19
Figure 7 :Spectre <i>DRX</i> de la bentonite et de PLA1 immobilisée.....	28
Figure 8:Spectre IRTF de la bentonite et de la PLA1 immobilisée.....	29
Figure 9 :Courbe de Répartition des Résidus DE Phosphore.....	33
Figure 10 : Valeur résiduel de Phosphore	34
Figure 11:Surface Plot de Phosphore, Enzyme et H ₂ O.....	35
Figure 12:Surface Plot de Phosphore,Enzyme et T°C.....	35
Figure 13:Surface Plot de Phosphore,Enzyme et Th.....	35
Figure 14 : Contour de phosphore, Enzyme et H ₂ O.....	36

Liste des figures

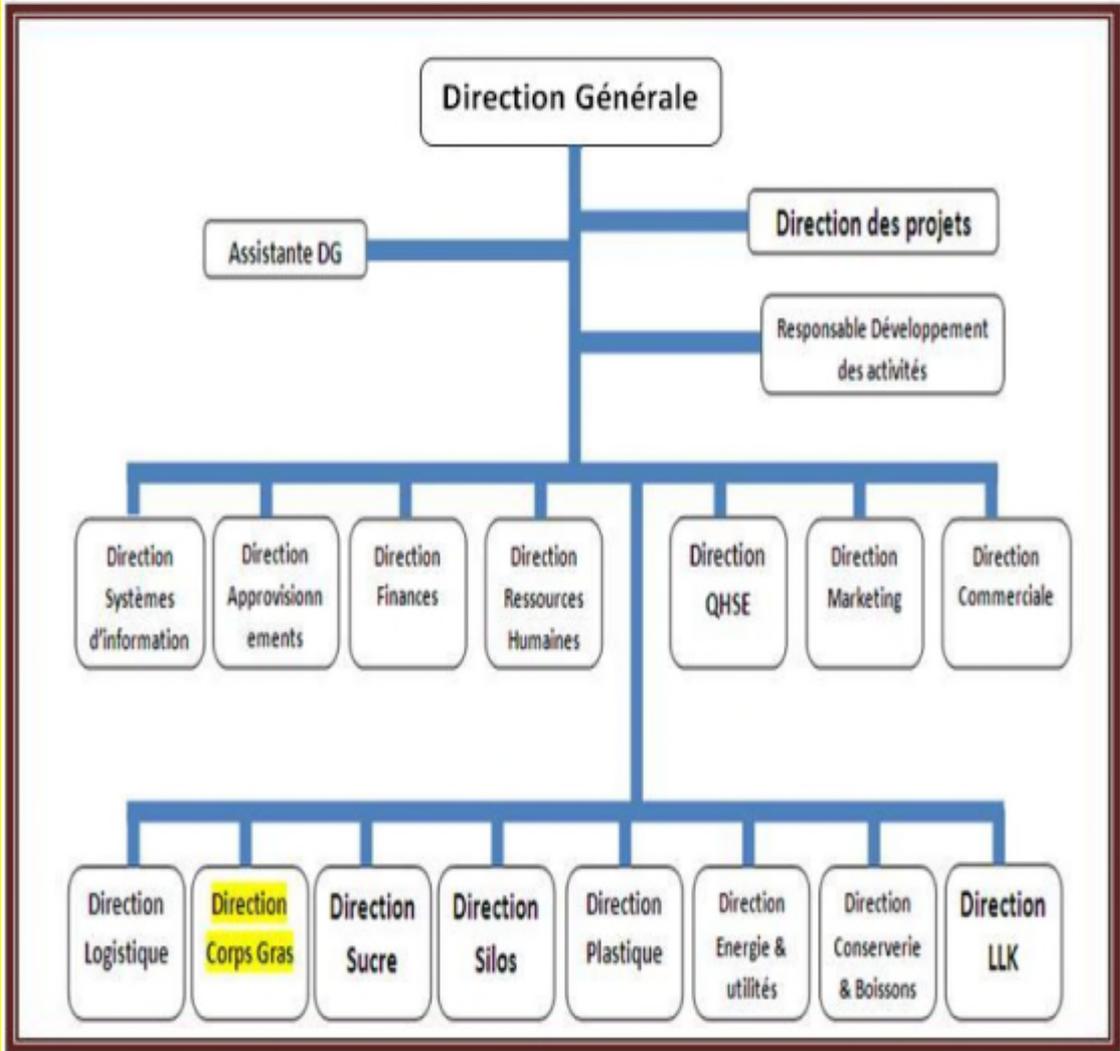
Figure 15 : Contour de phosphore, T h et Enzyme.....	36
Figure 16: Contour de phosphore, T h et H ₂ O.....	37
Figure 17 : Courbe de Répartition des Résidus de FFA.....	41
Figure 18 : Valeur résiduel de FFA.....	42
Figure 19:Surface Plot de FFA, Enzyme et H ₂ O.....	42
Figure 20 : Surface plot de FFA, Enzyme et T h.....	43
Figure 21: Surface plot de FFA, H ₂ O et T h.....	43

Liste des tableaux

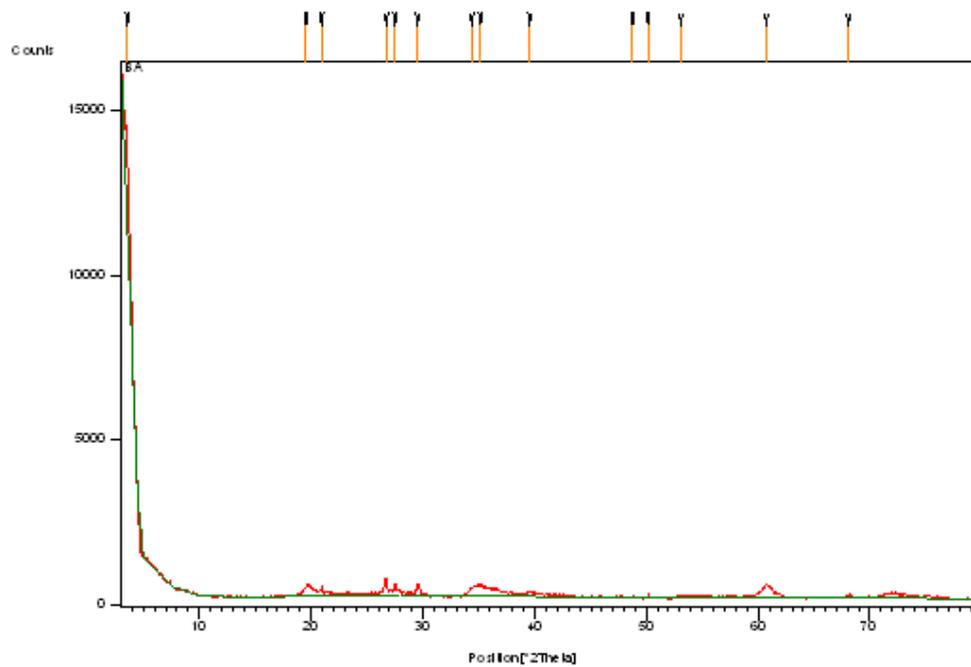
Tableau I: caractéristiques de la Lecitase Ultra®	15
Tableau II : Compositions minéralogiques et chimiques des terres de blanchissement.....	16
Tableau III : Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Brad Ford.....	18
Tableau IV : Gammes et niveaux expérimentaux des variables indépendantes d'essais.....	24
Tableau V : Conception expérimentale D-optimale dans les niveaux codés et les variables réels.....	24
Tableau VI : les résultats d'analyses des phosphore et FFA a partir de la conception expérimentale	30
Tableau VII : Coefficients de régressions estimés du modèle pour le phosphore.	31
Tableau VIII: Analyse de la variance pour le Phosphore.....	32
Tableau IX: Analyse des valeurs mesurée, calculé et les résidus de Phosphore.....	32
Tableau X : Coefficients de régressions estimés du modèle pour les (FFA).....	39
Tableau XI : Analyse de la variance pour de FFA.....	40
Tableau XII : Analyse des valeurs mesurée, calculé et les résidus FFA.....	40

Annexes

Annexe 1: Organigramme du groupe Cevital SPA



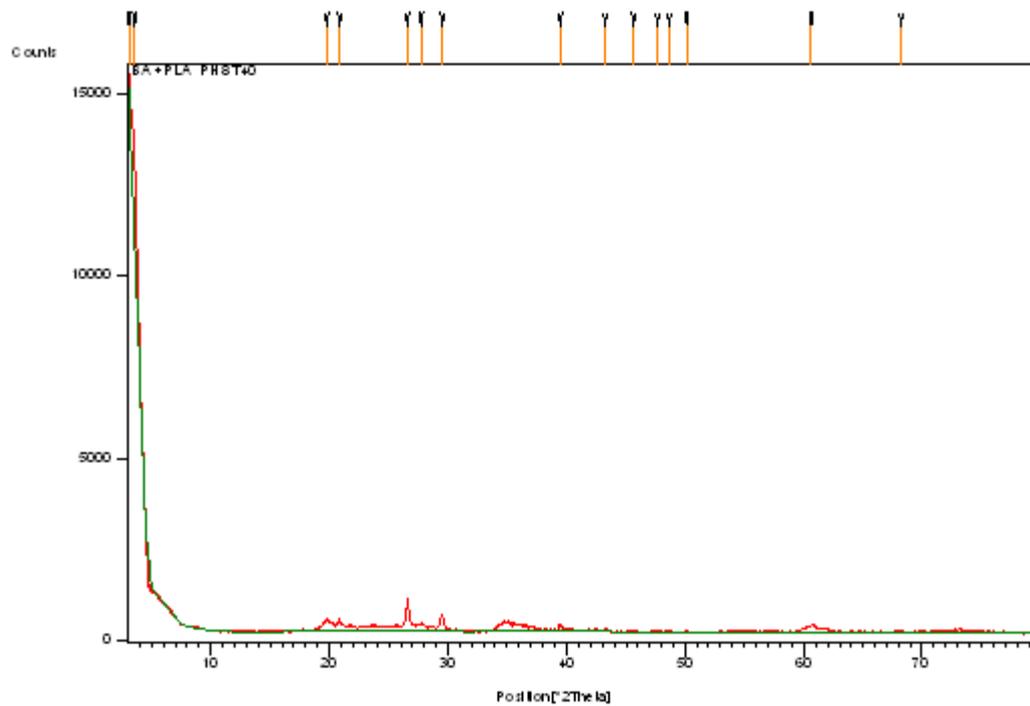
Annexe2 : le peak de la DRX pour Ba



Annexe3: Liste du peak DRX de la bentonite Activé(BA)

Pos. [°2Th.]	Height [cts]	FWHM [°2Th.]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]
3,5542	2592,97	0,2342	24,85996	100,00
19,5431	306,74	0,4684	4,54240	11,83
20,9340	271,47	0,1004	4,24363	10,47
26,7399	468,07	0,1004	3,33396	18,05
27,5288	381,37	0,1338	3,24019	14,71
29,5084	336,01	0,2676	3,02717	12,96
34,4055	263,54	0,6691	2,60668	10,16
35,1666	350,84	0,5353	2,55199	13,53
39,5514	185,22	0,2007	2,27860	7,14
48,7721	58,24	0,4015	1,86721	2,25
50,1654	90,03	0,4015	1,81856	3,47
53,0713	74,98	0,8029	1,72564	2,89
60,6783	415,90	0,5353	1,52625	16,04
68,0750	55,58	0,9792	1,37618	2,14

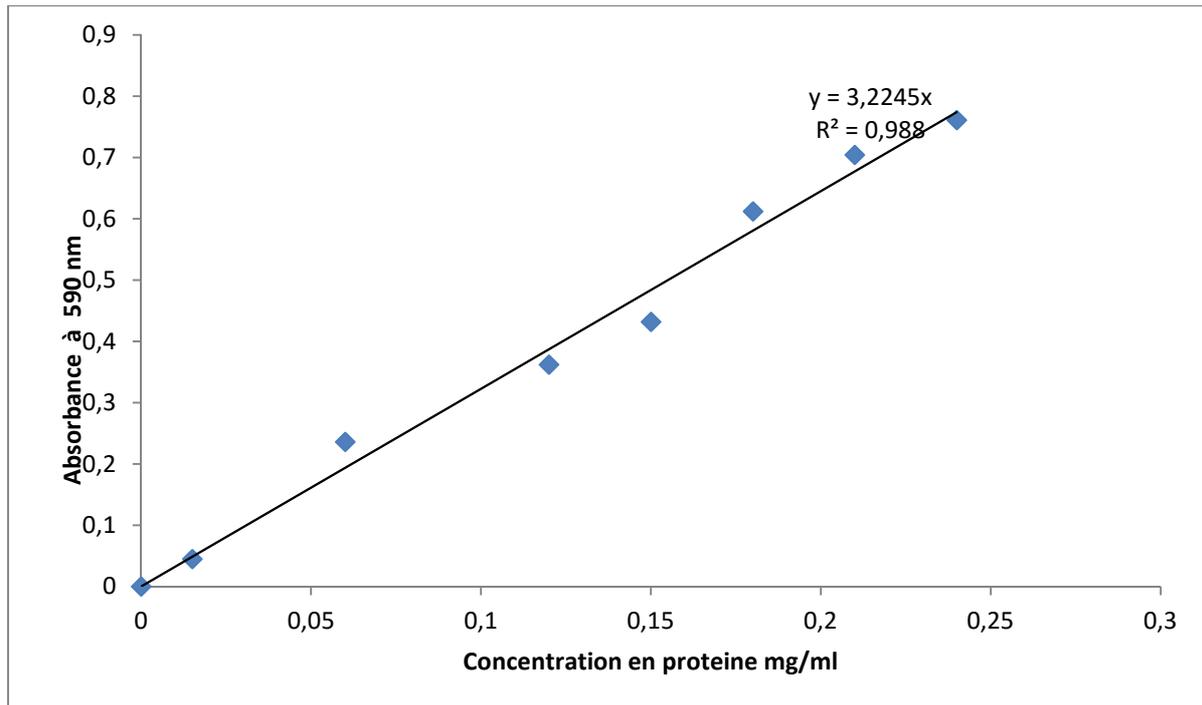
Annexe 4 : le peak de la DRX pour Ba + PLA1



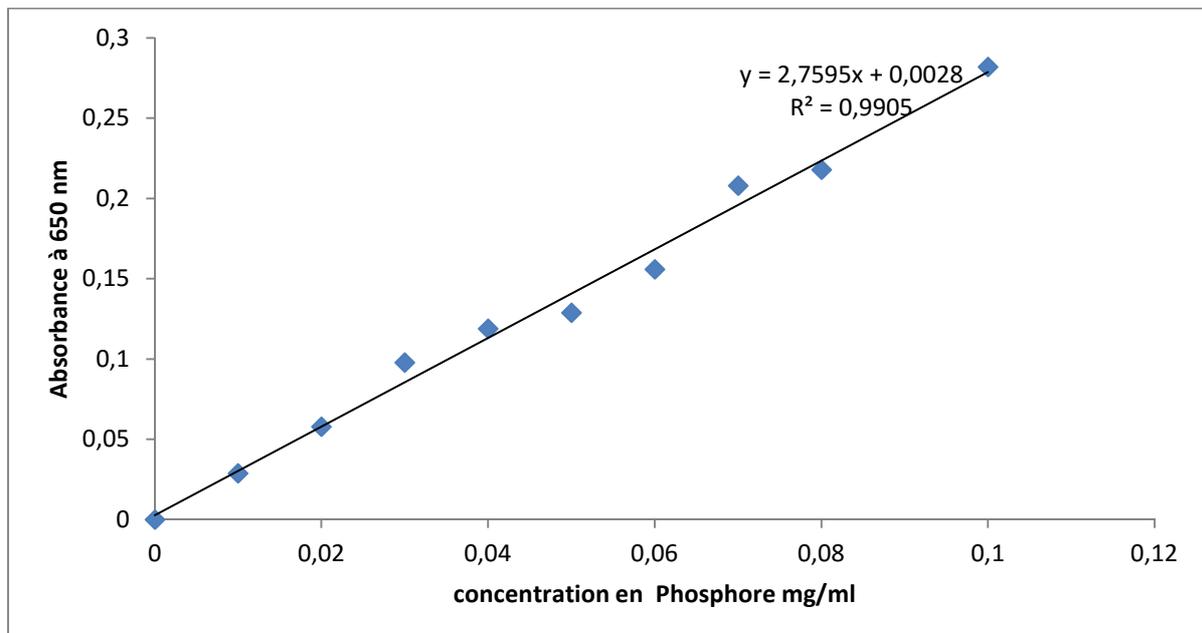
Annexe 5 : Liste du peak BA +PLA PH 8T40

Pos. [°2Th.]	Height[cts]	FWHM[°2Th.]	d-spacing[Å]	Rel.Int. [%]
3,0619	1644,38	0,2007	28,85543	61,35
3,5763	2680,14	0,2676	24,70644	100,00
19,7854	285,48	0,4684	4,48731	10,65
20,8494	318,90	0,1338	4,26066	11,90
26,6045	846,82	0,0836	3,35062	31,60
27,7292	191,87	0,4015	3,21723	7,16
29,4804	451,39	0,2676	3,02997	16,84
39,4564	173,58	0,2676	2,28386	6,48
43,2335	90,04	0,2676	2,09269	3,36
45,6498	45,29	0,5353	1,98738	1,69
47,6589	81,50	0,4015	1,90819	3,04
48,6408	81,80	0,2007	1,87194	3,05
50,1116	102,36	0,2007	1,82039	3,82
60,6216	203,83	0,5353	1,52754	7,61

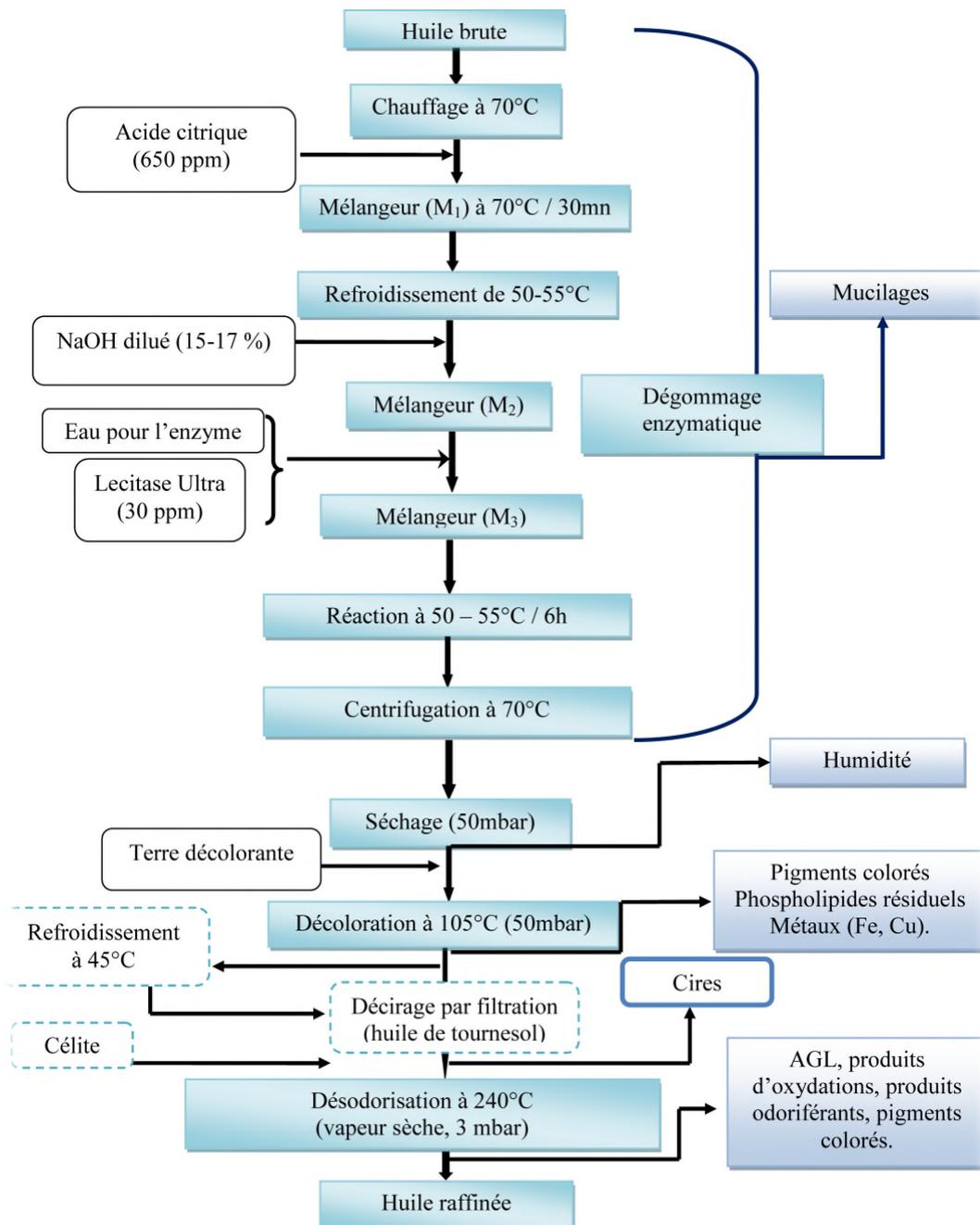
Annexe 6: Courbe d'étalonnage : dosage des protéines



Annexe7 : Courbe d'étalonnage : dosage de phosphore



Annexe 8 : Les étapes de raffinage de l'huile de soja et de tornosol



Annexe 9 : Procédé Raffinage Enzymatique

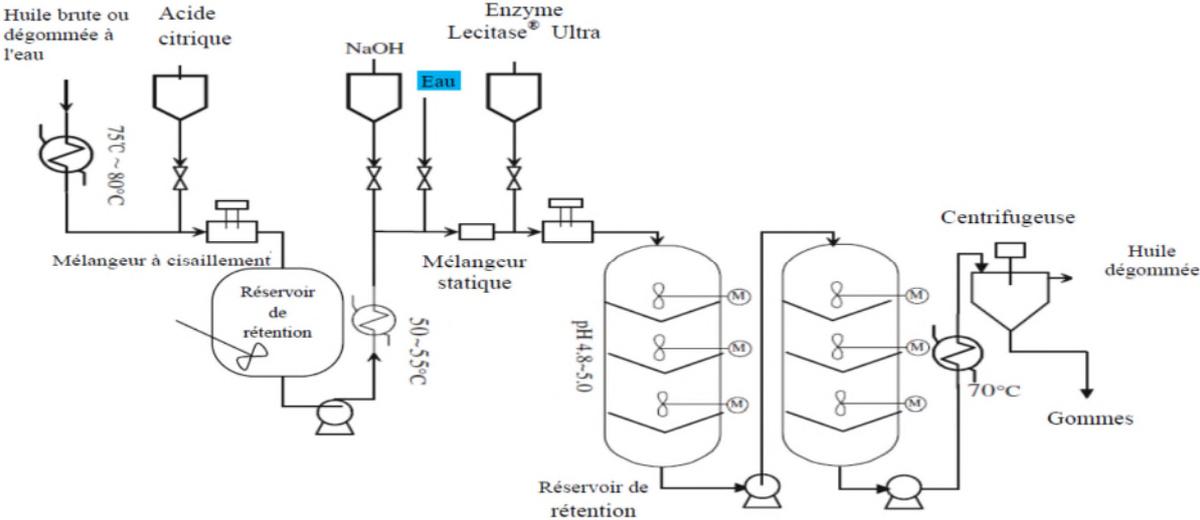


Table des matières

Sommaire

Introduction	01
CHAPITRE I : Synthèse Bibliographique	
I.1 Raffinage des huiles végétales	03
I.1.1 Les étapes du raffinage.....	03
I.1.1.a dégompage ou dé mucilagination.....	03
✓ Le dégompage a l'acide.....	03
✓ Le dégompage enzymatique.....	04
I.1.1.b Neutralisation.....	04
I.2 La phospholipases	05
a) HP.....	05
b) NHP.....	05
I.2.1 l'enzyme.....	06
✓ Définition.....	06
• Problématique.....	07
I.3 Modélisation	08
I.3.1. Methodologie des plans d'expérience.....	08
I.3.2. Les plans d'expériences fractionnaires.....	08
✓ Introduction.....	08
I.3.3. Plan fractionnaire $2^{(4-1)}$	08
I.3. 4 Analyse de régression sous forme matricielle.....	09
I.3.5 Plan factoriels complets à deux niveaux.....	09
I.4. Etat de l'art sur l'immobilisation des enzymes de pla1	10
I.4.1. Travaux sur l'immobilisation de l'enzyme PLA1.....	11
I.4.2. Les plans d'expérience.....	12
CHAPITRE II: Matériel et méthode	
II.1 Présentation du Complexe CEVITAL spa. Béjaïa	13
II.1.a Implantation.....	13
II.1.b La raffinerie d'huile.....	13

II.1.c Huiles produites.....	14
II.1.d Contrôle de la qualité.....	14
II.2. Normes et produits chimiques.....	15
II.3. Enzyme.....	15
II.3.1. La description de la phospholipase A1.....	16
II.4. Support pour l'immobilisation.....	16
II.4.1 Bentonite.....	16
II.5 Immobilisation de l'enzyme.....	17
II.5.1. Mesure du pH.....	17
II.6 Protocole d'immobilisation de l'enzyme.....	17
II.6.1 Caractérisation par DRX.....	17
II.6.2 Caractérisation par spectroscopie IRTF.....	18
✓ Mode opératoire	18
II.7 Dosage des protéines	18
II.7.1. Principe.....	18
II.7.2. Matériels et solutions utilisées.....	18
II.7.3. Mode opératoire.....	18
II.8 Expériences de demucilagination enzymatique.....	19
II.8.1. Principe.....	19
II.8.2. Matériels et solutions utilisé.....	19
II.8.3. Mode opératoire.....	19
II.9. Les analyses effectuées.....	20
II.9.1. Détermination de l'acidité.....	20
II.9.1.1. Mode opératoire.....	21
II.9.2. Détermination des phosphatides.....	21
II.9.2.1. Définition et principe.....	21

II.9.2.2 .Equipements et réactifs.....	21
II.9.2.3.Mode opératoire.....	22
II.9.2.4.Courbe d'étalonnage.....	22
II.10.Modélisation.....	23
II.10.1.Logiciel minitab 16.....	23
II.10.2. Programmation des essais.....	23
II.10.3. Methodologie de surface de réponse.....	23
II.11.Essai au centre.....	25
II.11.1. Validation de modèle (test de fichier)	26
a) Recherche de biais	26
b) Validation de l'équation de régression.....	26
II.11.2.Coefficient de détermination (coefficient de corrélation multiple).....	27
CHAPITRE III : Resultats et discussion	
III.1.Caracterisation physico-chimique de la bentonite.....	28
III.1.1. DRX.....	28
III.1.2.Spectroscopie Infra Rouge.....	29
III.2. Essai de dégommege de l'huile de soja par PLA1 libre et immobilisée sur la bentonite.....	30
III.2.1. Optimisation des paramètres phosphore.....	31
III.2.1.1. Réponse Surface Régression: Valeur P; Volume H2O (ml); Enzyme (g); T(°C) ; T(H)	31
III.2.2 Optimisation des paramètres d'élimination des acides gras libres (FFA).....	39
III.2.2.1. Réponse Surface Régression: Valeur P; Volume H2O (ml); Enzyme (g); T(°C) ; T(H).....	39
CONCLUTION	45
Références bibliographiques	
La liste des figures et tableaux	
Annexes	

ABSTRACT

Our study is based on the degumming of crude oil of bean. To achieve residual phosphorus levels lower than 10 ppm ,required content of phosphorus present in the oil before being marketed ,its hould optimize the following parameters :incubation time, percentage of water, incubation temperature and the initial concentration of enzyme.

For the realization of this study , a functional design of experiment at two levels was developed (2^{4-1} , I = - 123) The application of the matrix that results of this plan has allowed us to find the optimal conditions . The model, obtained gave the following optimum values of parameters : Temperature 52.5°C , initial concentration 0.35g/ ml, incubation time 6.25 h and a percentage of water of 1%.These optimal variables gave us an oil containing residual phosphorus content of 6.78 ppm.

Résumé

Notre étude est basée sur l'optimisation des paramètres les plus influents dans le dégommage de l'huile brute de soja. Pour atteindre un taux résiduelle de phosphore inferieure à 10 ppm, teneur requise en phosphore présent dans l'huile avant sa commercialisation, on doit optimiser les paramètres suivants: Temps d'agitation, le pourcentage d'eau, la température et le rapport de la masse d'enzyme/masse d'huile.

Pour la réalisation de notre étude ,nous avons élaboré un plan d'expérience fractionné à deux niveaux de forme 2^{4-1} alliacé par I = - 123. La mise en œuvre de la matrice qui en découle de ce plan, nous a permis de retrouver les points optimaux. La fonction de modélisation obtenue a donné les valeurs des paramètres optimums suivant température 52.5 °C , concentration initiale 0.35g/ml, temps d'agitation 6.25 h et un pourcentage d'eau de 1%. Ces variables optimales nous a données une huile contenant une teneur résiduelle en phosphore de 6.78 ppm.