

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



Réf:.....

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

MASTER

Thème

Immobilisation d'une phospholipase A1 sur un support solide : application dans le dégomme d'une huile alimentaire

Présenté par

ADJISSA Nadia & DILMI Karima

Soutenu le : **14 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Mr. KECHA. Mouloud	Professeur	President
Mr. BOUKERROUI. Abdelhamid	MCA	Encadreur
Mme. SOUAGHI. Samiha	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciement

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur Abdelhamid BOUKERROUI, avec qui nous avons le grand plaisir de travailler tout au long de ce mémoire, à qui nous exprimons nos profonds remerciements et reconnaissances pour sa patience et sa compréhension,

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Madame RAHMANI, technicienne du laboratoire microbiologie à l'université de Bejaia, pour son aide et son assistance.

Nous remerciant aussi le personnel de CEVITAL SPA qui nous ont accueillis et contribué au bon déroulement de notre stage au sein de l'entreprise,

Nous adressons nos plus vifs remerciements à tous les membres du jury ;

Monsieur le Professeur KECHA Mouloud professeur à l'Université de Bejaia pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce travail,

Madame SOUAGHI, docteur à l'université de Bejaia qui nous a fait l'honneur d'accepter d'examiner et de juger ce travail.

Nous remercions également tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

Je dédie ce travail :

*A mon père et ma mère pour tout le dévouement
qu'ils portaient à mes études et en reconnaissance de
l'éducation et de toute l'affection qu'ils ne cessent de
m'apporter;*

A mes frères et sœurs pour leur soutien moral ;

*A mon fiancer pour sa patience et pour son amour
et son soutien*

*A tous mes amis qui m'ont soutenu et à tous mes
camarades de la promotion biotechnologie microbienne*

*A tous ceux Qui m'ont témoigné leur affection et leur
soutien durant ces longues années.*

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents :

Vous avez comblés ma vie de tendresse,
D'affection et de compréhension.

A mes sœurs adorées : Sabrina et Emily

A tonton Djamel « Azouzou » pour son soutien tout au long de
mon parcours universitaire

A Mama Khira et à Mama Ndjima pour leur amour infini

A mes oncles, mes tantes et à tous mes cousins.

A mes amis (es), spécialement Damia et toute la promotion
Biotechnologie Microbienne 2015

De omni re scibili, et quibusdam aliis

Sihem

Liste des tableaux

Tableau II.1. Propriétés de la Lecitase[®]Ultra (Novozymes A/S, 2007).....16

Tableau II.2. Composition chimique de bentonite.....17

Liste des figures

Figure.1. Schéma du processus enzymatique du dégommege des huiles.....	4
Figure.2. Mode d'action des phospholipases.....	5
Figure.3. Relation entre la vitesse initiale et la concentration initiale du substrat	7
Figure.5. Facteurs influençant l'activité et la stabilité d'une enzyme.....	8
Figure.6. Modification de la bentonite par le CTMAB.....	12
Figure.8. spectres IRTF de : (a) PLA1-bentonite,(b) bentonite,(c) PLA1.....	18
Figure.9. Effet de la durée d'incubation sur l'activité phospholipasique.....	20
Figure.10.effet du pH sur l'activité phospholipasique (enzyme libre et immobilisée).....	21
Figure.11. Effet de la température sur l'activité phospholipasique.....	26
Figure.12.Effet de la durée sur l'activité lipasique de la PLA1 libre et immobilisée.....	28
Figure.13.Évolution de l'activité lipasique et phospholipasique en fonction de pH.....	29
Figure.14.Evolution de l'activité lipasique et de l'activité phospholipasique en fonction de la température.....	30
Figure 15. Evolution de l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1 libre en fonction du pH.....	31
Figure 16. Évolution de l'activité phospholipasique et l'activité lipasique de la PLA1 libre en fonction de la température.....	32
Figure .17. Évolution de l'activité lipasique et de l'activité phospholipasique en fonction du pH.....	33
Figure .18. Evolution de l'activité lipasique et de l'activité phospholipasique de l'enzyme immobilisée en fonction de la température.....	34
Figure.19. Représentation d'Arrhenius de l'énergie d'activation de la PLA1 libre et immobilisée.....	35
Figure .20. Représentation graphique de la cinétique de Michaelis-Menten.....	36

Figure .21. Représentation de Lineweaver-Burk pour les PLA1 libres et immobilisées.....	37
Figure.22.Variation du taux de phosphore dans l'huile traitée par l'enzyme libre et immobilisée.....	38

Résumé

L'objectif de cette présente étude est l'immobilisation d'une phospholipase A1 microbienne (lecitase® Ultra) dérivée d'une culture *d'Aspergillus oryzae* génétiquement modifié, sur une bentonite modifiée par le CTMAB et son application dans le dégommeage d'une huile alimentaire de Cevital. Le travail porte sur la détermination des paramètres optimums de pH, de température et de la durée d'incubation. L'optimisation de ces paramètres a permis de tester les propriétés de la phospholipase immobilisée sur le dégommeage d'une huile alimentaire brute. L'immobilisation de l'enzyme sur le support de bentonite a été prouvée par sa caractérisation par la méthode physicochimique FTIR, disponibles à l'université de Bejaia. Les résultats obtenus ont montrés que les paramètres optimums sont : pH= 5.5, invariable pour l'enzyme libre et immobilisée, la température est de 40°C pour l'enzyme libre et de 50°C pour l'immobilisée. La cinétique enzymatique appliquée aux résultats a montré que pour le paramètre cinétique de Vmax, les valeurs obtenus sont de 2,51mmole/min pour PLA1 libre et 1.94 mmole/min pour l'immobilisée. La valeur de Km est de 75.88 mg /ml pour PLA1 libres et 82.12 mg /ml pour l'immobilisée. L'application de l'enzyme immobilisée sur le dégommeage de l'huile a permis de réduire la teneur en phosphore présent dans ce dernier de 195 ppm à 7.4 ppm (valeur < à la norme de 10 ppm) après 6 heures d'incubation et une valeur nulle après 7 h.

Mots clés : PLA1, bentonite modifiée, CTMAB, immobilisation, dégommeage.

The aim of the present study is the immobilization onto modified (CTMAB) bentonite, of microbial phospholipase A1 (Lecitase Ultra) derived from a culture of the *Aspergillus oryzae* genetically modified, and its application in degumming soybean oil (Cevital edible oil). The work focuses on determining the optimum parameters of pH, temperature and time of incubation. The optimization parameters were used to test the properties of the immobilized phospholipase on degumming of crude edible oil. The immobilization of the enzyme on the carrier bentonite has been proven by its physicochemical characterization by FTIR method, at the University of Bejaia. The results obtained have shown that the optimum parameters are: pH = 5.5, invariable for free and immobilized enzyme, the temperature is from 40 ° C to the free enzyme and 50 ° C to immobilized. Enzyme kinetics applied to the results showed that for the kinetic parameter Vmax values obtained were 2.51 mmol / min for free PLA1 and 1.94 mmol / min to the immobilized. The Km is 75.88 mg/ml for free PLA1 and 82.12 mg/ml immobilized. The application of the immobilized enzyme on the oil degumming has reduced the content phosphorus from 195 ppm to 7.4 ppm (< 10 ppm) after 6 hours of incubation and 0 ppm after 7h.

Key word: PLA1, modified bentonite, CTMAB, immobilization, enzymatic degumming.

Abréviations

Liste des abréviations

- ✚ PLA1 : Phospholipase A1
- ✚ PVA : Polyvinyl alcohol
- ✚ BA : Bentonite Activée
- ✚ BAM : Bentonite Activée et Modifiée
- ✚ CTMAB : Cethyl Trimetyl Ammonium Bromide
- ✚ RP : Recta Pure
- ✚ DRX : Diffraction des rayons X
- ✚ FTIR : Fourier Transformed Infra Red spectroscopy (spectroscopie infrarouge a transformé de Fourier)
- ✚ BSA : Bovin Sérum Albumine
- ✚ TAG : Tri Acyle Glycérol
- ✚ SN1 : Site Numéro 1
- ✚ ppm : particules par million.
- ✚ **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.

Sommaire

Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures.....	v
Liste des abréviations.....	vi
Introduction.....	1
Chapitre I synthèse bibliographique	
1.1. Le raffinage des huiles.....	2
1.1.1. Les étapes du raffinage	2
1.1.2. Les type du raffinage.....	2
a) Raffinage physique	2
b) Raffinage chimique	3
c) Raffinage enzymatique.....	3
1.1.3. Le dégompage enzymatique.....	3
1.2. Les phospholipases.....	3
1.2.1. Définition de la phospholipase A1.....	4
1.3. Le concept de l'activité enzymatique.....	5
1.4. Cinétique enzymatique.....	5
1.5. Technique d'immobilisation.....	7
1.5.1. Principe d'adsorption.....	8
1.6. Support d'immobilisation.....	8
1.6.1. Définition de la bentonite.....	8
1.6.2 La bentonite modifiée.....	8
1.7. Effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique.....	10
1.7.1. Stabilité	10
1.7.2. Inactivation.....	10
Chapitre II matériels et méthodes	
Partie pratique	11
II.1. Matériels.....	16
II.1.1. Enzyme.....	16
II.1.2. Support pour l'immobilisation.....	17
II.1.3. Autres produits et réactifs chimiques utilisés.....	17

II.2.1. Préparation du tampon.....	18
II.2.2. Méthode expérimentale utilisée pour l'immobilisation de la PLA1.....	18
II.3. Préparation du tampon.....	18
II.2.3.1. Méthodes de caractérisation physico-chimique de la bentonite.....	18
a) Spectroscopie infrarouge.....	18
II.4.2. Dosage des protéines.....	19
II.4.3. Détermination de l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme.....	19
II.4.3.1. Activité lipasique.....	19
II.4.3.2. Activité phospholipasique.....	20
II.4.3.3. Optimisation de la durée.....	20
II.4.3.4. Optimisation du pH et de la température.....	20
II.5. Essai de dégommage enzymatique de l'huile de soja.....	20
II.6. Dosage des phosphores.....	21
Chapitre III. Résultats et discussion	
III.1. Caractérisation physico-chimique de la bentonite.....	22
III.1.1. Analyse par spectroscopie IRTF.....	22
III.2. Dosage des protéines.....	23
III.3. Etude de l'activité enzymatique de la PLA1 libre et immobilisée.....	23
III.3.1. Effet de la durée sur l'activité phospholipasique.....	24
III.3.2. Effet du pH sur l'activité phospholipasique.....	24
III.3.3. Effet de la température sur l'activité phospholipasique.....	26
III.3.4. Effet de la durée sur l'activité lipasique.....	26
III.3.5. Effet du pH sur l'activité lipasique de la PLA1.....	26
III.3.6. Effet de la température sur l'activité lipasique de la PLA1.....	27
III.4. Comparaison entre l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1.....	29
III.4.1. Activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme libre.....	30
III.5. Détermination des paramètres cinétique.....	33
III.6. Energie d'activation.....	35
III.7. Essai de dégommage.....	38
Conclusion.....	41
Bibliographie	

Introduction

En raison de l'application de plus en plus croissante des enzymes dans les procédés industriels, l'étude de leurs propriétés fonctionnelles est devenue primordiale, et ceci afin de cerner les conditions optimales de leurs applications, de les adapter aux conditions opératoires des procédés et de garantir leur efficacité.

Par ailleurs, le domaine des biocatalyseurs constitue une thématique de recherche très attractive et devient le centre d'intérêt de plusieurs équipes de recherche. En effet, certaines visaient l'amélioration des propriétés chimiques des enzymes tels que la stabilité aux conditions opératoires (pH, Température, pression, etc.) et biochimiques comme la sélectivité, comme d'autres, se concentraient sur l'aspect économique de leurs utilisations et travaillaient sur l'immobilisation qu'ils considéraient comme la meilleure démarche qui permet, non seulement l'amélioration de la stabilité de l'enzyme, mais aussi réduire le coût de sa production delà de son utilisation (**Grim, 2011**).

Le coût de production et d'utilisation des enzymes reste un inconvénient majeur pour des applications à grande échelle. Pour y remédier, l'immobilisation des biocatalyseurs demeure une voie envisageable. A cet effet, des enzymes immobilisées ont été utilisées avec succès dans plusieurs procédés industriels. Toutefois, la réussite d'une telle procédure dépend fortement de la méthode d'immobilisation et de la nature du support utilisé et le type d'enzyme (**Guisan, 2006**).

L'immobilisation par la méthode d'adsorption reste la plus simple et la moins coûteuse. En outre, les argiles minérales et en particulier la bentonite ont prouvés leur efficacité dans leur utilisation comme support d'immobilisation des enzymes (**Ghiachi, 2009**).

L'enzyme concernée par la présente étude est la phospholipase A1, du nom commerciale Lecitase Ultra et récemment développée par Novozymes. Cette enzyme est largement appliquée dans les procédés de dégomme enzymatique des huiles végétales. L'objectif de notre travail est de caractériser cette enzyme, d'étudier les paramètres influençant son activité catalytique en utilisant la bentonite modifiée comme support d'immobilisation (**Nilsen, 2003**).

Le présent travail est divisé en trois chapitres ; comprenant une analyse bibliographique sur les travaux et les résultats de la littérature dans le premier chapitre, le second chapitre est consacré à la partie pratique de notre travail et les résultats obtenus sont discutés dans le troisième chapitre. On termine notre travail par une conclusion générale.

1. Raffinage des huiles alimentaires

Les huiles brutes renferment un certain nombre d'impuretés indésirables, responsables d'une mauvaise conservation, du goût et de l'odeur désagréables. Le raffinage a pour but, d'éliminer les acides gras libres, les produits d'oxydation, les arômes désagréables, les colorants, les produits toxiques (tels que pesticides, glycosides), mais également les phospholipides ainsi que les métaux (tels que fer et cuivre) présents à l'état de traces et généralement liés à des composés organiques. Le raffinage comprend une série de traitements qui sont : La démulcination, la neutralisation, le lavage, le séchage, la décoloration, la filtration et la désodorisation (**Picaud, 2010**).

1.1. Etapes du raffinage

Il existe trois grandes étapes de raffinage et qui sont regroupées dans l'annexe 6.

1.2. Les différents types du raffinage

a) Le raffinage physique

Le raffinage physique consiste à éliminer les acides gras libres par distillation sous un vide poussé lors de la désodorisation à haute température (240- 260 °C). Les phospholipides et les autres impuretés doivent être éliminés préalablement par un prétraitement (lavage à l'eau). Seules les huiles saturées et acides (palme, coprah) sont adaptées à subir ce type de raffinage ; les huiles polyinsaturées, sensibles à l'oxydation, ne peuvent pas être raffinées de la sorte.

b) Le raffinage chimique

Le raffinage chimique se compose principalement des étapes de démulcination (dégommage), neutralisation, décoloration, désodorisation. Il sert à éliminer les acides gras libres et les phosphatides, par une étape de neutralisation à la soude. La teneur en phosphore dans l'huile de soja raffiné passe sous le seuil de 10 ppm. Après désodorisation la teneur en phosphore devient nulle.

c) Le raffinage enzymatique

C'est un type de procédé physique performant qui produit des rendements en huile plus élevés. Il consiste à transformer les phospholipides non hydratés en lyso-phospholipides facilement hydratés sous l'action d'une phospholipase A1. La teneur en phosphore de l'huile de soja démulcinée passe sous le seuil des 10 ppm, atteignant même des teneurs de 3 ppm, résultats comparables à ceux du procédé chimique. Après désodorisation, la teneur en phosphore de l'huile devient quasiment nulle (**Mahran, 2007**).

I.1.3. Le dégommage enzymatique

Le dégommage enzymatique comparativement aux procédés classiques a beaucoup d'avantages. Indépendamment de la réduction des quantités d'acides et de bases utilisées, on a une réduction des effluents polluants produits pendant le procédé de raffinage ainsi qu'un perfectionnement dans les rendements de produit et une réduction des frais d'exploitation (Yang *et al*, 2008). Le dégommage enzymatique offre un chemin biotechnologique, sans risque de pollution de l'environnement.

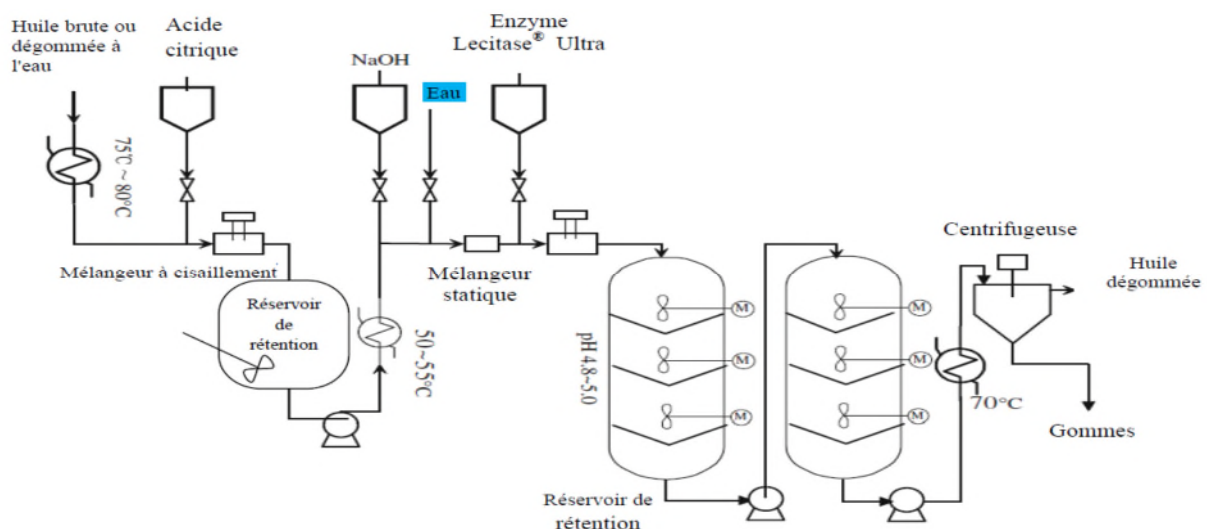


Figure 1. Schéma général du processus de dégommage enzymatique des huiles

I.2. Les phospholipases

Les phospholipases forment une grande classe d'enzymes avec une large diversité, elles sont répandues chez les procaryotes et les eucaryotes. Les groupes de classification les plus simples sont les acyles hydrolases et les phosphodiésterases. Chacun de ces deux groupes est représenté par différents types de phospholipases et cela selon le site d'action de l'enzyme au niveau de la molécule de phospholipide (figure 2). On considère que les phospholipides ont deux liaisons d'ester carboxyliques et deux liaisons d'ester de phosphate.

Les acyles hydrolases incluent la phospholipase A1 (PLA1), la phospholipase A2 (PLA2), la phospholipase B (PLB). Les phosphodiésterases sont représentées par la phospholipase C (PLC) et la phospholipase D (PLD). En outre, chaque famille a beaucoup de sous-groupes ou

d'iso enzymes, appartenant aux mêmes groupes. Ainsi, des centaines de phospholipases ont été purifiées, caractérisées.

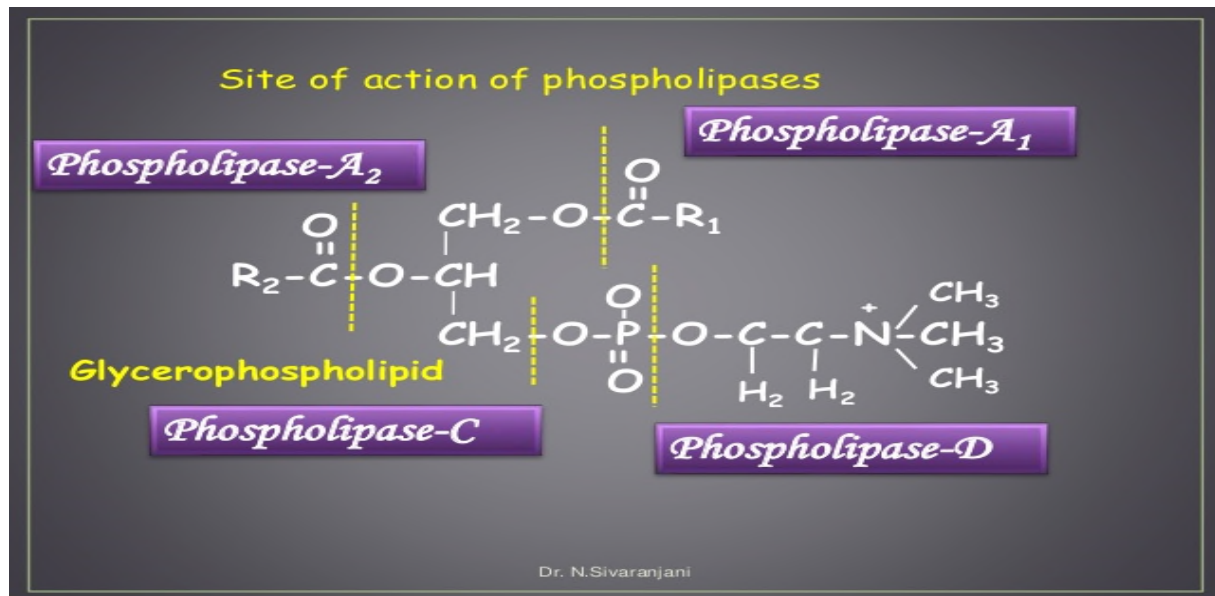


Figure 2. Mode d'action des phospholipases

2.1. Définition de la phospholipase A1

La phospholipase A1 (EC 3.1.1.32) (PLA1), représente un sous-groupe très divers des phospholipases avec une activité hydrolytique des liaisons ester des phospholipides à la position SN1, produisant un lysophospholipide et un acide gras libre. Des auteurs ont constatés que, non seulement la PLA1 présente une activité phospholipasique considérant les phospholipides comme substrats, mais exprime également une activité lipasique capable d'attaquer les TAG (Guo *et al*, 2005). La Lecitase® Ultra est une enzyme produite par fermentation submergée d'une culture d'*Aspergillus oryzae* génétiquement modifiée contenant le gène de la phospholipase A1 dérivé de *Fusarium venenatum* (pour l'activité phospholipasique) et un autre gène provenant de *Thermomyces lanuginosus* (pour une meilleure stabilité). Il est important de noter que cette enzyme est beaucoup plus utilisée dans le procédé de dégomme des huiles végétales (Tanka, 1993), (Yang *et al.*, 2006), (Sheelu *et al.*, 2008)

3. Le concept de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique représente le potentiel catalytique maximum d'une enzyme. Plusieurs facteurs affectent l'expression d'un tel potentiel. Les plus importants sont la température et le pH. Dans le cas d'une enzyme immobilisée, d'autres variables sont à prendre en considération telle que la concentration en protéine. En effet, l'activité enzymatique dépend linéairement de la concentration protéique de l'enzyme, quoique la concentration en substrat et son effet constitue la base des hypothèses d'étude de la cinétique enzymatique (**Illanes *et al.*, 2008**). Elle est exprimée en Unité. L'Union International de Biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB) recommande de l'exprimer en unité internationale (UI), définissant une unité internationale comme la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 μmol du substrat par minute dans les conditions standard de température, du pH optimal, et de la concentration optimale en substrat. Elle dépend strictement de la structure moléculaire de l'enzyme et compte sur l'existence d'une structure appropriée de son site actif. Par conséquent, n'importe quel agent qui conduit aux déploiements de la protéine séparerait les résidus constituant le site actif et réduirait aussi son activité. Les conditions défavorables de température, du pH, de solvant, de présence de métaux lourds et des agents chélateurs peuvent provoquer une perte de fonction en déformant la configuration appropriée du site actif. Les propriétés cruciales, comme la stabilité enzymatique dépendent énormément de la structure tridimensionnelle de l'enzyme (**Copeland *et al.*, 2000**). La stabilité n'est pas liée à l'activité et dans plusieurs cas, elle a une tendance opposée (**Buchholz *et al.*, 2005**). La stabilité est clairement liée au raidissement moléculaire tandis que la flexibilité conformationnelle est avantageuse pour la catalyse. Ceci peut être clairement apprécié en étudiant l'inactivation thermique des enzymes : l'augmentation de l'activité enzymatique avec la température provoque en contrepartie, une baisse de la stabilité enzymatique. Cette tendance opposée rend la température une variable critique dans n'importe quel procédé enzymatique et elle est sujette à une optimisation. D'autres facteurs peuvent affecter l'activité et la stabilité d'une enzyme. Mais d'une façon générale, le pH et la température sont les facteurs les plus importants à considérer (**Vincent *et al.*, 2004**).

I.4. Cinétique enzymatique

Les valeurs de la constante de Michaelis –Menten K_m et de la vitesse maximale V_m , peuvent fournir certains renseignements sur l'activité de l'enzyme, bien qu'il fallait avant tout tenir compte de la concentration de l'enzyme pour savoir quelle sera l'efficacité de son action. La K_m nous renseigne sur l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat. Quand elle est

élevée, cela signifie que l'affinité est faible. Quand elle est basse, cela veut dire que l'affinité du substrat pour l'enzyme est forte. Pour les concentrations en substrat inférieures ou égales à K_M , la vitesse de la réaction dépend de la vitesse d'association entre enzyme et son substrat.

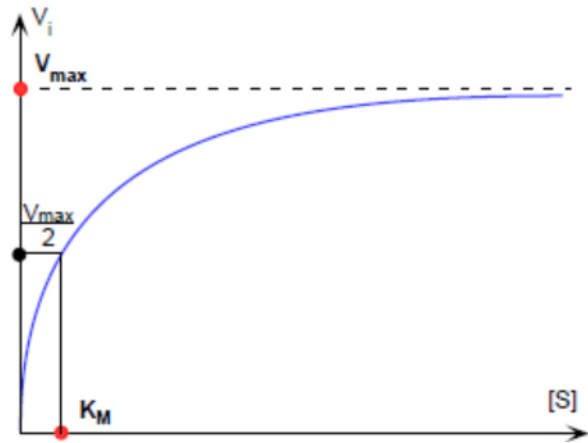


Figure 3. Représentation graphique de Michaelis - Menten

Si l'on mesure cette vitesse en présence d'une quantité constante d'enzyme et des quantités variables de substrat, (la température et le pH étant maintenus constants), on obtient une courbe telle que celle qui est représentée sur la figure 3. La vitesse augmente jusqu'à un certain point au-delà duquel elle reste constante : c'est la vitesse maximale de la réaction ou V_{max} .

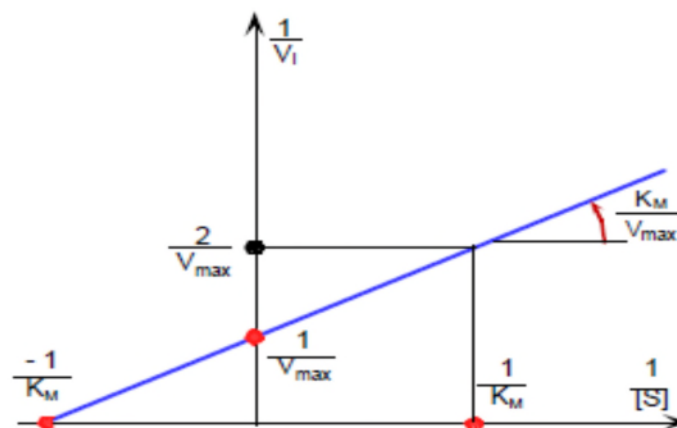


Figure 4. Représentation graphique de lineweaver et Burk

L'enzyme est alors saturée par le substrat. Cette courbe est une hyperbole rectangulaire dont l'équation générale est de la forme : $y = a.x / (b + x)$, où a et b sont des

constantes. Soit la vitesse (V) en fonction de la concentration en substrat $[S]$, $V = f([S]) = a \cdot [S] / (b + [S])$ Une analyse cinétique réalisée la première fois par les chercheurs Michaelis et Menten permet de démontrer que, pour une réaction catalysée par une enzyme, a est égal à V_{max} ; la constante b est appelée Constante de Michaelis-Menten K_m .

L'équation de **Michaelis-Menten** s'écrit :

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

La détermination graphique directe de V_{max} et K_m n'est pas toujours très précise, et d'autres méthodes ont été proposées, elles reposent sur la linéarisation de l'équation de Michaelis et Menten. En prenant l'inverse de la vitesse on obtient :

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

Cette écriture de l'équation de Michaelis-Menten est appelée représentation de Lineweaver-Burk. La représentation graphique $1/V = f(1/[S])$ est une droite de pente $\frac{K_m}{V_{max}}$ Cette représentation est utilisée pour le calcul de V_{max} et K_m de la PLA1 (libre et immobilisée) (**Chang *et al.*, 2005**).

5. Technique d'immobilisation

Les enzymes peuvent être immobilisées soit par rétention physique, soit par liaison chimique, comme on peut aussi combiner les deux méthodes pour assurer une meilleure fixation de l'enzyme. La rétention physique exploite la grande différence de taille entre l'enzyme et le substrat, d'où l'idée de créer une barrière semi-perméable pour retenir l'enzyme, elle peut être un réseau, une capsule ou une membrane. L'enzyme peut être fixée sur un support soit par de simples interactions ioniques (adsorption) (**Jesionowski *et al.*, 2014**). Soit par la création d'une vraie liaison covalente (**Miletia *et al.*, 2009**).

5.1. Principe d'adsorption

L'immobilisation par adsorption demeure la méthode la plus simple et la moins coûteuse. C'est une méthode dans laquelle, l'enzyme est liée à la surface d'un support par des interactions non spécifiques de type hydrophobes, 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. Un des grands avantages de cette technique est qu'il ne cause aucune modification chimique à l'enzyme ou au support. Cependant, l'enzyme peut se détacher du support (désorption) en raison de la nature réversible des liaisons (**Jesionouski et al., 2014**), des conditions physiques (lessivage) et autres facteurs tels que le pH, la nature du solvant et la température (**Secundo et al., 2008**).

6. Support d'immobilisation

Diverses méthodes ont été développées pour l'immobilisation des enzymes. Les types de support peuvent être classifiés selon leur composition chimique, telle que les supports organiques ou inorganiques comme le montre le tableau I présenté en annexe 4.

6.1. Définition de la bentonite

La bentonite est une argile issue de l'altération et la transformation hydrothermale des tufs volcaniques, elle fait partie principalement du groupe des smectites. Son nom provient de fort Benton à l'USA. En plus de la montmorillonite le composant principal de la bentonite, elle peut contenir également le feldspath, la biotite, la kaolinite, l'illite, la cristobalite, le pyroxène, le zircon, et le quartz cristallin. (**Bergaya, 2006**).

La structure cristalline des smectites est constituée d'une couche octaédrique d'alumine entre deux couches tétraédriques de silice. Ces trois-couche sont empilés une au-dessus de l'autre, lié entre elles aux sommets des couches par des atomes communs d'oxygènes, formant ainsi un feuillet. Entre les feuillets réside un espace appelé espace interfoliaire. Ceci produit un lien faible, permettant à l'eau et à d'autres molécules polaires de pénétrer entre les feuillets et d'induire une dilatation de la structure minérale ou gonflement (**Lukham, 1999**).

6.2. La bentonite modifiée

La structure de la bentonite est composée de l'oxyde d'aluminium dans la coordination octaédrique et de SiO₂ dans la coordination tétraédrique, l'aluminium (trivalent) peut être substitué par un cation divalent, le magnésium ou le fer créant ainsi un déficit de charge dans la structure globale de l'argile. Le déficit de charge est compensé par des cations mobiles appelé cations compensateurs qui viennent se loger dans l'espace inter foliaire en s'entourant

de plusieurs molécules d'eau. La nature des cations échangeables affecte la quantité de prise d'eau et donc du gonflement. La perte d'eau de rétention entre les feuillets de silicate a lieu aux températures relativement basses 100-200° C. La perte de l'eau structurale (c.-à-d., les hydroxyles) commence entre 450 et 500 °C et est complète à 600-750 °C (Besq *et al.*, 2003). L'adsorption non ionique de matières organiques sur la bentonite est relativement faible en raison de l'attraction préférentielle des molécules d'eau polaires à la surface minérale polaire. Le CTMAB par un phénomène d'échange cationique vient modifier les propriétés de la bentonite qui deviendrait organophile et pourrait attirer dans son espace inter foliaire des molécules organiques, le CTMAB est un surfactant à double polarité (polaire et apolaire) ou un coté se lie à la surface de l'argile et l'autre se lie à la substance organique accompagnatrice tel que l'enzyme. (Cai *et al.*, 2014).

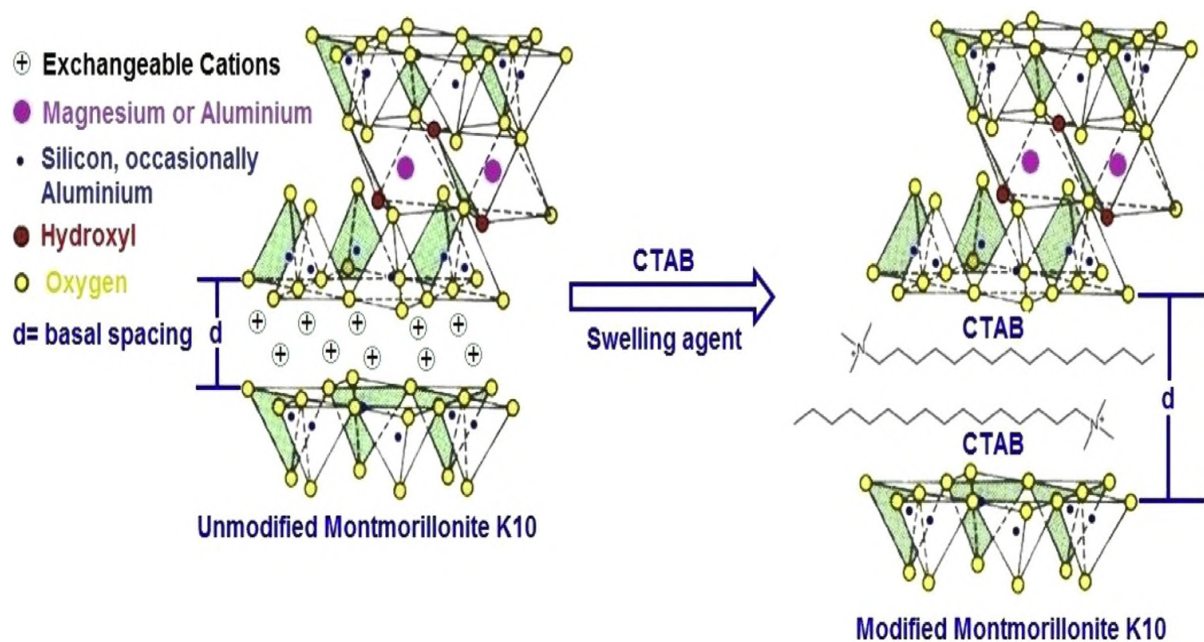


Figure 5. Schéma de la modification de la bentonite par le CTMAB (Kiransan *et al.*, 2014)

7 .Effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique

7.2. La Stabilité

Les auteurs qui ont menés des études sur l'immobilisation des enzymes confirment l'amélioration de la stabilité de l'enzyme, si l'immobilisation est correctement faite. L'immobilisation de l'enzyme dans une structure poreuse protégera l'enzyme contre l'interaction avec d'autres molécules enzymatiques. Les molécules d'enzymes peuvent également être protégées contre les bulles d'air qui proviennent d'une forte agitation qui peuvent entraîner leurs inactivations.

D'autre part, la stabilité est le résultat d'un compromis entre deux facteurs : la flexibilité, pour la fonction catalytique de l'enzyme, et la rigidité, pour la stabilité conformationnelle. L'enzyme immobilisée est plus rigide que l'enzyme libre. Cette rigidité la protège contre le déploiement et préserve sa structure catalytique active. Par conséquent, l'immobilisation permet à l'enzyme d'être active d'une façon optimale dans des conditions de dénaturation (les températures plus élevées) (**Scherer *et al.*, 2011**).

7.3. Inactivation

Dans le cas où les techniques d'immobilisation exigent des conditions extrêmes de réaction (pH élevé ou présence d'oxydant), certaines molécules d'enzymes immobilisées peuvent être désactivées. En outre, l'enzyme peut s'attacher au support par le site actif, de ce fait le substrat ne peut pas accéder au site actif qui est bloqué. Ainsi, la valeur de l'activité de l'enzyme immobilisée est habituellement moindre que celle de l'enzyme libre (**Guisan, 2006**)

1. Description du complexe industriel agroalimentaire CEVITAL

Implanté à proximité du port de Bejaïa, il est le plus grand complexe agroalimentaire privé en Algérie. Aujourd'hui, CEVITAL SPA, offre des produits de qualité meilleure et à des prix compétitifs, grâce à son savoir-faire, ses unités de production ultramodernes, son contrôle strict de qualité et son réseau de distribution performant. La raffinerie d'huile de CEVITAL couvre les besoins nationaux et a permis à l'Algérie de passer du rang d'importateur à celui exportateur d'huiles végétales alimentaires raffinées.

Dans une optique de maîtrise totale de la production et d'intégration globale, CEVITAL a mis en place un projet de trituration de graines oléagineuses qui lui permettra de triturer 7.500 tonnes/jour dont 5.000 tonnes de graines de soja et 2.500 tonnes de graines de colza (**Cevital 2007**)

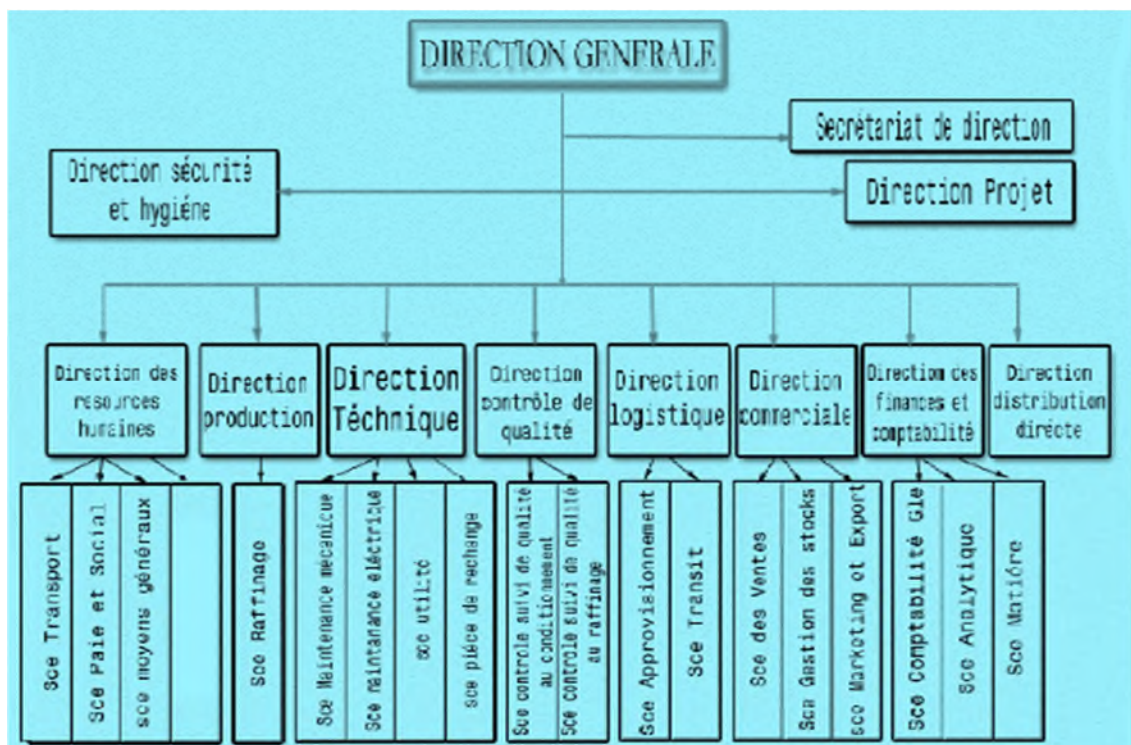


Figure 1. Organigramme du complexe CEVITAL SPA

Partie pratique

1. Activités de CEVITAL

Les diverses activités de CEVITAL sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Type d'Activité	Capacité de production
Raffinage d'huile	1.800 tonnes/jour
Raffinage de sucre	1.600 tonnes/jour
Production de margarine et d'huiles végétales	600 tonnes/jour
Fabrication d'emballage en P.E.T(Polyéthylène Téréphtalate) et conditionnement	-
Epuration des eaux usées	-
Traitement des pâtes de la neutralisation	-

2. Présentation de la raffinerie

La raffinerie du complexe CEVITAL est entièrement automatisée. C'est l'une des plus modernes au monde, elle est composée de deux chaînes de raffinage A et B de marque ALFA LAVAL (Suède) d'une capacité de plus de 400 tonnes chacune (800 tonnes /jour) et d'une ligne C de 1.000 tonnes/jour, de marque DE SMET(Belgique).

❖ Approvisionnement en matières premières

CEVITAL s'approvisionne essentiellement en huiles brutes en fonction du marché demandeur fournisseur. Les huiles les plus connues et les plus consommées en Algérie sont l'huile de tournesol, de soja et de colza. Elles sont importées, par bateaux de gros tonnages, de certains pays producteurs tels que : l'Ukraine, la Malaisie et l'Argentine.

L'huile est déchargée dans des cargos par les pipelines directement reliés aux cuves de stockage. Un bateau peut être vidé de sa cargaison en quelques heures.

La capacité de stockage dont dispose la raffinerie CEVITAL (47.000 tonnes d'huile brute), permet une production d'une durée de 3 mois.

Les différentes huiles brutes traitées par CEVITAL sont :

- **Les huiles fluides** : Nécessitent un raffinage physique et chimique (soja, tournesol, colza, maïs).

Partie pratique

- **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, provenant du fractionnement de l'huile de palme par cristallisation à sec à 28°C.

❖ Conditionnement

C'est la mise sous emballage des huiles afin d'assurer leur conservation et leur transfert depuis le lieu de fabrication jusqu'aux consommateurs.

La matière utilisée pour les emballages est le P.E.T (Poly Ethylène Téréphtalate). La graine de P.E.T est séchée, fondue sous forme de pâte puis injectée dans des moules pour former des préformes, qui passent par une souffleuse (par type 1L, 2L et 5L). Les emballages vides obtenus sont orientés automatiquement vers une remplisseuse rotative, puis vers une bouchonneuse, ensuite une étiqueteuse dateuse.

Les bouteilles sont enveloppées avec du film Cellophane thermo rétractable puis passent dans le four de la fardeuse pour former les fardeaux, et enfin vers la palettiseuse afin d'être stocké.

Les huiles de CEVITAL disponibles sur le marché sont :

- ✓ FLEURIAL: 100 % tournesol commercialisée depuis août 1999.
- ✓ SOYA: 100 % soja commercialisée depuis septembre 1999.
- ✓ CANOLA: 100 % colza commercialisée depuis fin septembre 1999.
- ✓ 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.

❖ Traitement des déchets

Tableau 1. Traitement des déchets

<ul style="list-style-type: none"> • Décomposition de la pâte 	<p>Le traitement du soap stocks a pour but de récupérer les huiles acides et d'évaluer les pertes en huile.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Epuration des eaux 	<p>Elle a pour but le traitement des eaux de lavage du raffinage avant de les déverser dans la nature, ainsi que celles destinées à la chaudière.</p> <p>Quant aux déchets qualifiés d'huile acides, sont revendus aux producteurs de savons, de peinture, de mastic... etc.</p>

3. Contrôle de la qualité

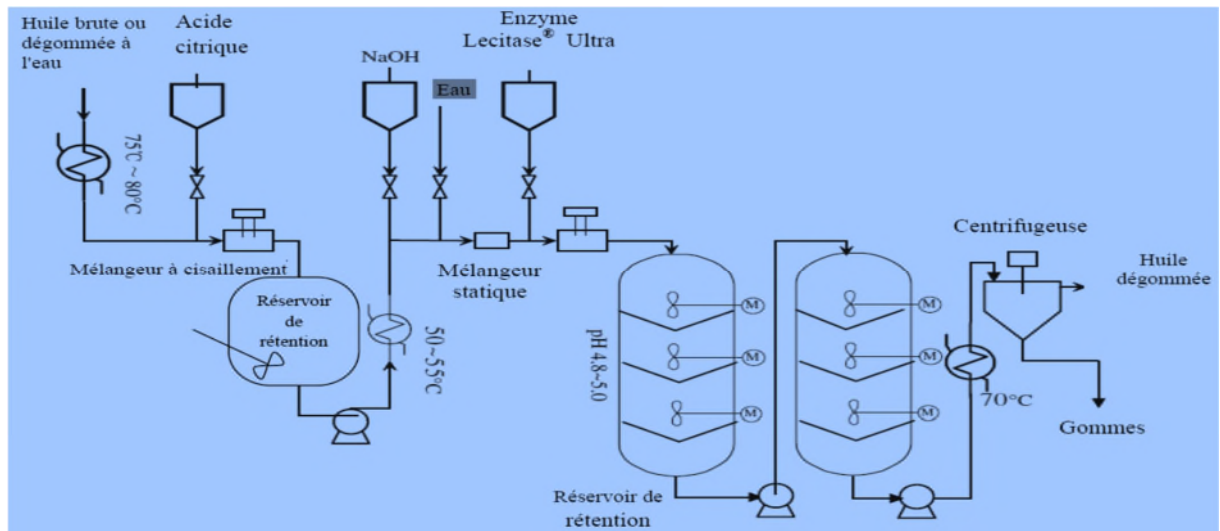
Le complexe CEVITAL est doté de cinq laboratoires comme indiqués dans le Tableau2 ci-dessous.

Tableau 2 : Les différents laboratoires du complexe CEVITAL.

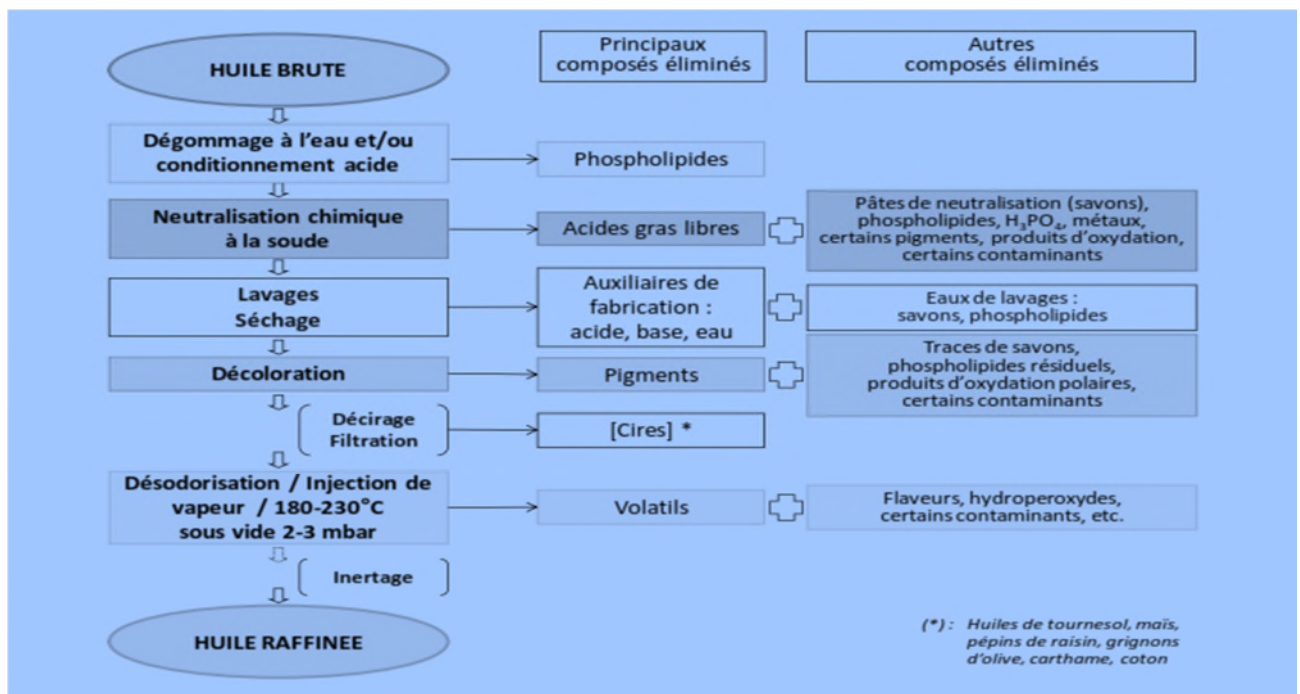
Deux laboratoires pour les huiles	Laboratoire de la raffinerie : Il a pour tâche le suivi permanent du processus de raffinage par des analyses physico-chimiques;
	Laboratoire de conditionnement : Il est destiné au contrôle physico-chimique de la matière première (huile brute) à son arrivée au port et des produits finis. En réalité le contrôle se fait aux différents stades, de l'arrivée de l'huile brute jusqu'à la commercialisation de l'huile raffinée.
Un laboratoire pour la margarine	Conçu pour le contrôle physico-chimique de la margarine ;
Un laboratoire pour le sucre	Il est destiné au suivi des différents paramètres physico-chimique du sucre.
Un laboratoire de microbiologie	Conçu pour l'analyse du sucre, margarine, et produits laitiers destinés à sa fabrication (crème, lait...).

4. les procédés de dégommage des huiles alimentaires

4.1. Procédé enzymatique



4.2. Procédé chimique



Remarque : Tout le matériel et réactifs utilisés sont représentés dans l'annexe 3

Et tous les tests ont été triplés et les moyenne ont été calculées.

Matériels

1. Enzyme

L'enzyme utilisée dans cette étude est une phospholipase A1. Cette enzyme est produite par modification génétique d'un micro-organisme et commercialisée sous le nom de Lecitase®Ultra par Novozymes A/S (Danemark). Cette enzyme nous a été gracieusement offerte par la société CEVITAL SPA, Bejaïa. Les propriétés de la Lecitase®Ultra, comme mentionnées dans la fiche technique de CEVITAL, sont récapitulées dans le tableau I.

Tableau I. Propriétés de la Lecitase®Ultra (Novozymes A/S, 2007)

Propriétés	
Forme physique	Liquide
Couleur	brune
Microorganisme producteur	<i>Aspergillus oryzae</i>
Microorganisme donneur	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
Température de stockage	0 -10 °C
Activité déclarée	10 KU/g

2. Support pour l'immobilisation

Le support d'immobilisation de la PLA1 est une bentonite activée à l'acide sulfurique et commercialisée par Taïko® Classic 1G (Malaysia). Elle est utilisée dans le raffinage des huiles lors de l'étape de la décoloration. Le support a été modifié au niveau du laboratoire par un surfactant qui est le Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAMB).

Tableau II. Composition chimique de bentonite (source entreprise)

Composé	Quantité (%)
SiO ₂	72,2
Al ₂ O ₃	11,2
FeO ₃	2,7
MgO	0,8
CaO	2,3
Na ₂ O	0,6
K ₂ O	0,6
Perte au Feu	12.68

3. 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 à 10% et de l'huile d'olive. L'alcool polyvinylique (PVA) à 4% a été employé comme agent tensio-actif dans la préparation des solutions de substrats. Le tampon utilisé dans cette étude a été préparé avec l'acide citrique 0.1M et l'hydrogénate de phosphate di-sodique (Na₂HPO₄) 0.2M. Tous les autres produits chimiques utilisés étaient de qualité analytique Recta Pure (RP). Toutes les solutions ont été préparées avec de l'eau distillée.

Méthodes

1. Modification de la bentonite

La bentonite activée a été modifiée on s'inspirant des travaux de Dong et al. (2012), (2013) avec quelques aménagements et effectuer comme suite : 5g de bentonite sont ajoutés à 2g de CTMAB dans 100 ml d'eau distillé, la suspension est maintenue sous agitation constante dans un bain marie à 60°C pendant 20h. Ensuite le mélange a été centrifugé puis lavé trois fois avec de l'eau distillé et séché dans une étuve à 60°C pendant 72h.

2. Méthode utilisée pour l'immobilisation de la PLA1

La PLA1 a été mélangée avec la solution tampon citrate pH7.5 selon un rapport volumique 1:5. L'immobilisation sur la bentonite a été réalisée par adsorption en ajoutant au support la solution enzymatique à un rapport volume/masse 5 : 0.5. La suspension a été maintenue sous agitation constante à la température ambiante pendant une nuit. Ensuite, la bentonite est séparée par filtration après lavage avec l'eau distillé. Les eaux de lavages sont récupérées et soumis aux analyses des protéines (Dong *et al.*, 2012).

3. Préparation du tampon

Les solutions tampons ont été préparés selon les méthodes décrites dans Lange's Handbook of Chemistry. Les solutions tampon citrate ont été préparées à partir de l'acide citrique 0.1M et du Na₂HPO₄ 0.2M suivant le protocole contenu dans la littérature sus citée (Annexe 3).

4. Méthodes analytiques

4.1. Caractérisation physico-chimique de la bentonite par spectroscopie intra rouge.

Dans le cadre de notre étude nous rappelons la technique de caractérisation de solide (bentonite) par la spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier FTIR (Fourier Transformed Infra Red spectroscopy), qui est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

Lorsque la longueur d'onde par-delà l'énergie apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistre alors une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. Le domaine infrarouge est compris entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} ($2.5 - 25\text{ }\mu\text{m}$). Il correspond aux domaines d'énergies de vibrations et de rotation des molécules.

L'absorption de l'énergie va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent, à un matériau de composition chimique et de structure donnée, va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre à infrarouge qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde ou nombre d'onde auxquelles le matériau absorbe.

Les groupements fonctionnels du surfactant et de la bentonite (à titre comparatif) ont été identifiés sur des pastilles de KBr, alors que l'enzyme –liquide est directement introduite dans l'appareil par la méthode d'injection.

4.2. Dosage des protéines

La teneur en protéines de l'enzyme libre et dans les eaux de lavage a été déterminée par la méthode de Bradford, (**Bradford, 1976**), en utilisant la BSA comme étalon. Le dosage a été effectué par spectrophotométrie 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).

4.3. Détermination de l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme

4.3.1. Activité lipasique

L'activité lipasique a été déterminée par la méthode titrimétrique comme décrite par Yang et al. (2006). l'huile d'olive et l'alcool polyvinylique à 4% sont émulsionnés avec un rapport volumique (1 : 4). 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 20 min à 40°C. La réaction est stoppée par ajout de 15 ml d'éthanol. Les acides gras libérés sont titrés par une solution de NaOH 0.05 N. Une unité lipasique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 μmole d'acides gras libres titrables par minute dans les conditions décrites ci-dessus.

4.3.2. Activité phospholipasique

L'activité phospholipasique a été déterminée en utilisant la lécithine de soja à 10 % comme substrat et l'alcool polyvinylique et le mélange est émulsionné avec un rapport volumique de 1:4 dans un solvant organique qui est le chloroforme. Les conditions d'analyse sont identiques à celle de l'activité lipasique.

4.3.3. Optimisation de la durée d'incubation

Pour déterminer la durée optimale, l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme libre et immobilisée a été effectuée à une valeur de pH de la solution tampon d'acide citrique (pH= 7), à une température de 40°C et la durée d'incubation a été varié de 10 à 60 min.

4.3.4. 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 de pH de la solution tampon d'acide citrique (pH 4 - 8). La température optimale a été déterminée en variant la température de 20 à 80 °C.

5. Détermination des paramètres cinétiques

Pour déterminer les paramètres cinétiques de Michaelis-Menten (k_m et V_{max}) de l'enzyme libre et immobilisée, la concentration du substrat (lécithine) dans le système d'essai a été variée sur une gamme d'intervalle de 20-140 mg/ml, dans les conditions optimales de pH, de températures et de concentration d'enzyme constante.

6. Essai de dégommage enzymatique de l'huile de soja

L'essai de dégommage de l'huile brute de soja a été réalisé en batch avec la PLA1 libre et immobilisée en utilisant les conditions optimales recommandées par Novozymes (**Dianyu et al., 2012**). 200ml de l'huile de soja et un volume de 0.13 ml d'acide citrique (45 %) ont été mélangés dans un ballon 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). Un petit volume d'eau a été ajouté à l'huile sous agitation à raison de 3 ml. La PLA1 libre ou immobilisée a été ajoutée à l'huile à une dose de 200 U/kg de l'huile. Le mélange a été incubé (60°C) sous agitation mécanique (30 rpm) pendant une durée de 7 heures. Les échantillons

pour l'analyse de phosphore ont été prélevés à des intervalles d'une heure. Après 10 h le mélange a été centrifugé pour enlever la PLA1 immobilisé ainsi que les gommés mucilagineuse.

II.7. Dosage de phosphore

La teneur en phosphore a été déterminée selon la méthode rapportée par Yang et al. Et effectuée comme suite : 0.5 mg d'oxyde de zinc et 3 g de l'huile sont calcinés à 600 °C pendant 2heures jusqu'à obtention de cendre blanche. Le dosage du phosphore a été déterminé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 650nm selon la méthode AOCS Ca 12-55. (AOCS, 1997) La courbe d'étalonnage (Annexe2) a été utilisée pour déterminer la teneur en phosphore contenue dans l'huile brute et traités par l'enzyme libre et immobilisée.

1. Caractérisation physico-chimique

Afin d'identifier les propriétés physico-chimiques, la bentonite a été caractérisée en utilisant la spectrométrie Infra Rouge (IRTF) disponible au niveau de l'université de Bejaia.

1.1. Analyse par spectroscopie IRTF

Afin de mettre en évidence les groupements fonctionnels du CTMAB et de l'enzyme immobilisée présents dans la bentonite, nous avons fait appel à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, les résultats obtenus sont représentés dans la figure 8.

L'examen des spectres fait apparaître des pics aux bandes d'absorption entre 400 et 4000 cm^{-1} et selon les travaux de la littérature en rapport avec notre étude, nous présentons les observations comme ci-dessous :

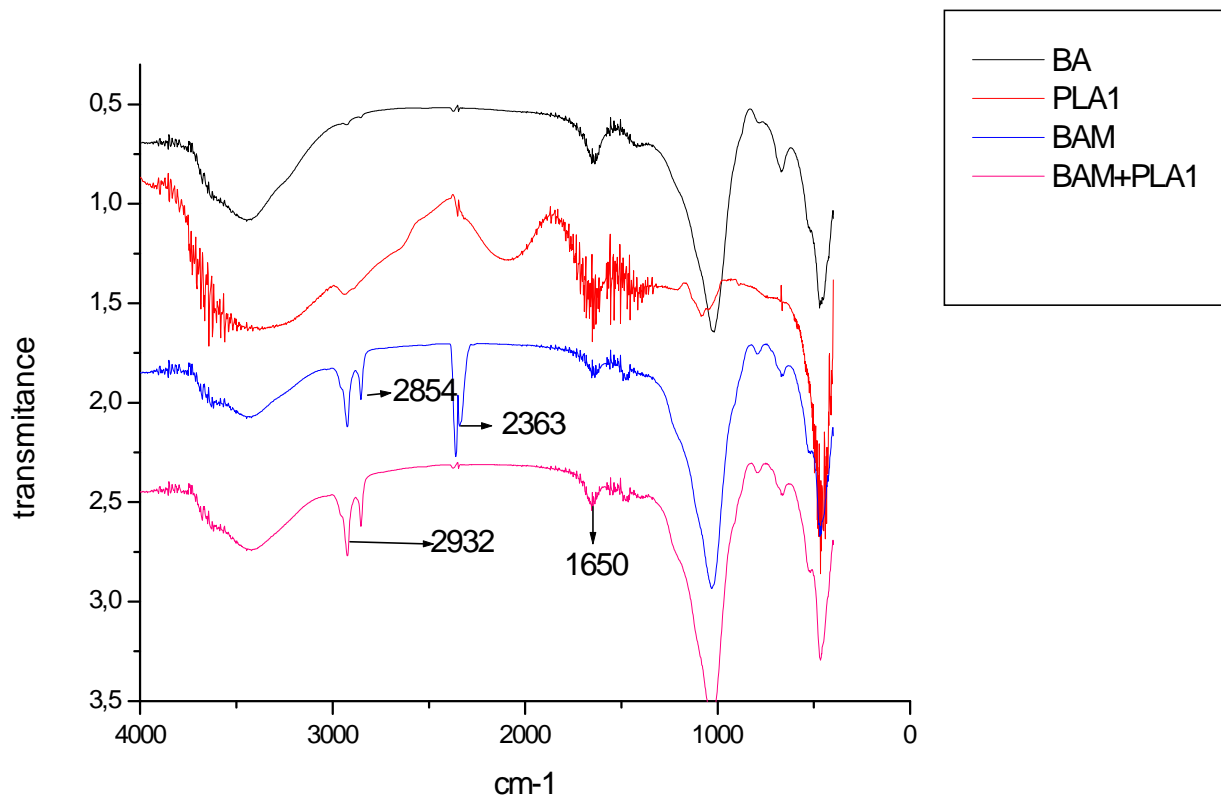


Figure 8. Spectre IRTF de la bentonite activée (BA), bentonite modifiée par le CTMAB (BAM), de la PLA1 libre (PLA1) et de la bentonite modifiée + enzyme (BAM+ PLA1).

Les spectres infrarouges de la bentonite modifiée avant et après adsorption de l'enzyme montrent deux bandes particulières à 2932 et à 2854 cm^{-1} (**Kiransan et al., 2014**). Ces deux bandes sont relatives aux vibrations asymétriques et symétriques d'étirement des groupements C-H du CTMA. L'absence de ces deux pics dans le spectre BA indique que l'incorporation de l'agent tensio-actif a bien eu lieu dans la structure feuilletée de BA (intercalation dans l'espace inter-foliaire de l'argile).

Les spectres de la figure 8 (spectre PLA1 et spectre BAM+PLA) nous montrent la présence du pic de l'amide I à 1650 cm^{-1} de l'enzyme immobilisée qui est observé dans les deux spectres (**Dong et al., 2012**). Ce qui nous confirme l'intercalation de l'enzyme PLA1 dans l'espace inter-foliaire du support de bentonite

Cependant, l'intensité du pic de la BAM+PLA à 1650 cm^{-1} a diminué, il se pourrait qu'il est perturbé par le pic de vibration des hydroxyles de la bentonite (spectre BA) (**Dong et al., 2012**).

Le pic à 2363 cm^{-1} dans les spectres de BAM correspondent à la vibration de la liaison de dioxygène de carbone, (**Liu et al., 2011**).

2. Dosage des protéines

Le taux de protéine contenant dans la préparation commercial de la lecitase Ultra a été déterminé en utilisant la méthode Bradford, les résultats obtenus donne une concentration de 11mg/ml de protéine, et l'analyse des eaux de lavage a montré un taux d'incorporation atteignent les 85%.

3. Etude de l'activité enzymatique de la PLA1 libre et immobilisée

Afin de déterminer l'activité enzymatique de la PLA1, on a utilisé la lécithine de soja à 10 % comme substrat pour déterminer l'activité phospholipasique et l'huile d'olive pour déterminer l'activité lipasique. La méthode utilisée est inspirée de celle décrite par (**Yang et al., 2006**). Les mesures de l'activité de la phospholipase ont été effectuées à différentes valeurs de durée d'incubation, du pH et de température.

$$\text{activité enzymatique } U/ml = \frac{C_f - C_i * D}{t}$$

Telle que :

Cf : concentration des acides gras libérés dans le milieu réactionnel

Ci : concentration des acides gras dans le mélange témoin

D : le facteur de dilution de l'enzyme

t : le temps d'incubation

Les résultats exprimés en activité relative sont donnés par la relation suivante.

$$\text{Activité relative} = \frac{\text{Activité enzymatique}}{\text{L'activité enzymatique maximale}} \times 100$$

3.1. Effet de la durée d'incubation sur l'activité phospholipasique

L'effet de la durée d'incubation sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée a été déterminé à une température de 40°C et un pH de 7 de la solution tampon citrate 0.05 N sur un intervalle de temps allant de 10 à 60 min. les résultats obtenus sont représentés dans la figure 9 ci-dessous.

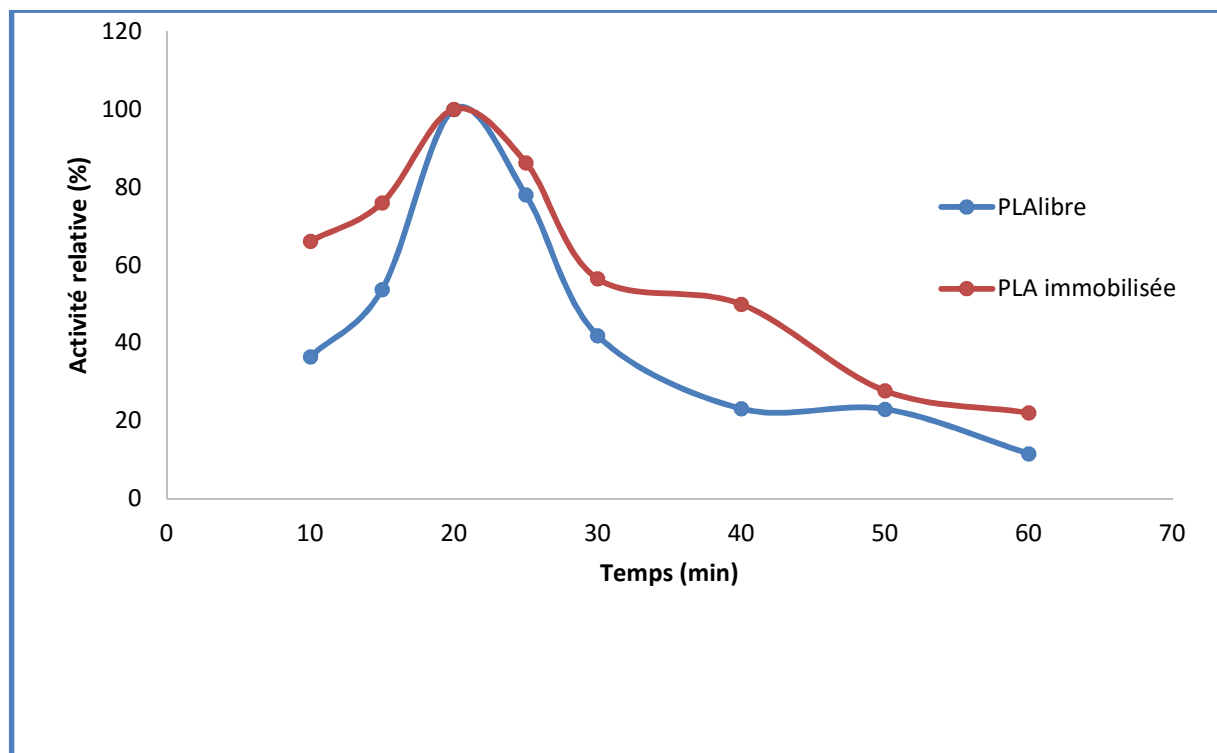


Figure 9. Effet de la durée d'incubation sur l'activité phospholipasique

Le temps d'incubation optimum est de 20 min. On a observé une activité relative de 100 % correspondant à une activité phospholipasique de 1227 U/ml après 20 min d'incubation à 40 °C et à pH 7. Cette durée de 20 min est similaire à celle des travaux de la littérature sur l'optimum du temps d'incubation (Yang *et al.*, 2006).

3.2. Effet du pH sur l'activité phospholipasique

La variation du pH a un effet significatif sur l'activité enzymatique et la plupart des enzymes montrent une dépendance de leurs activités à l'égard de ce paramètre. L'effet du pH sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée a été déterminé à une température de 40 °C, en variant le pH de la solution tampon citrate 0.05 N, de 4 à 8. Les résultats obtenus sont représentés par le tracé de la figure 10.

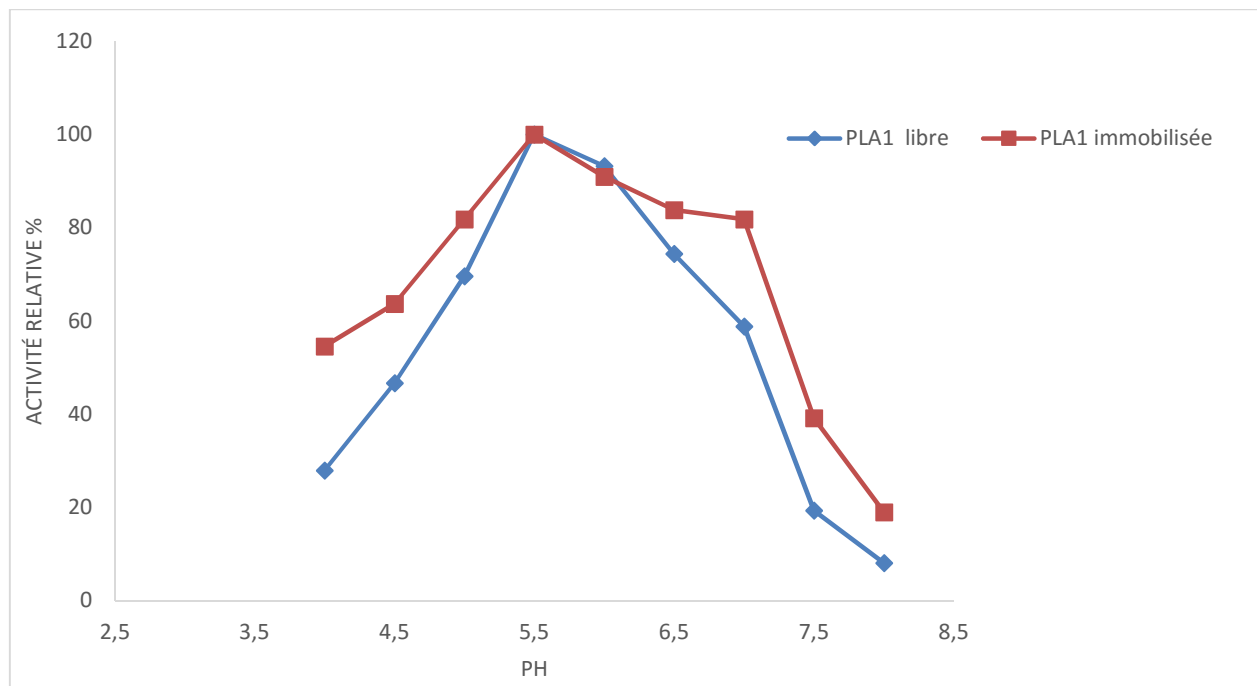


Figure.10. Effet du pH sur l'activité phospholipasique (enzyme libre et immobilisée)

Les résultats de la figure 10, montrent l'effet du pH sur l'activité phospholipasique variant de 4 à 8 à 40°C pour l'enzyme libre et immobilisée. On observe que l'enzyme libre et immobilisée exhibe une activité maximale à pH 5.5.

La phospholipase A1 est une lipase à caractère acide. Ce qui indiquerait que la PLA1 hydrolysait les phospholipides sous des conditions d'acidité plus au moins élevée (Dianyu *et*

al., 2012). En outre, l'immobilisation n'a pas eu d'effet significatif sur le pH de l'environnement réactionnel de l'enzyme.

Les résultats montrent aussi que l'immobilisation a un effet de stabilisation de l'activité enzymatique. En effet, l'enzyme immobilisée maintient son activité relative à plus de 80% pour des pH allant de 5.5 à 7, alors que l'enzyme libre ne garde que 58 % à pH 7 et atteint des valeurs inférieures à 20 % à pH 7.5. Des résultats similaires ont été observés par certains auteurs (*Dianyu et al.*, 2013) et (*Xiaofei et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que la PLA1 libre est plus sensible aux variations du pH comparativement à la PLA1 immobilisée.

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. (*Augère, 2001*).

III.3.3.Effet de la température sur l'activité phospholipasique

Étant donné que la stabilité de l'enzyme est de première importance dans l'industrie, l'effet de la température sur l'activité phospholipasique de l'enzyme a été étudié.

Les résultats de l'effet de la température sur l'activité de la PLA1 libre et immobilisée sont représentés dans la figure 11.

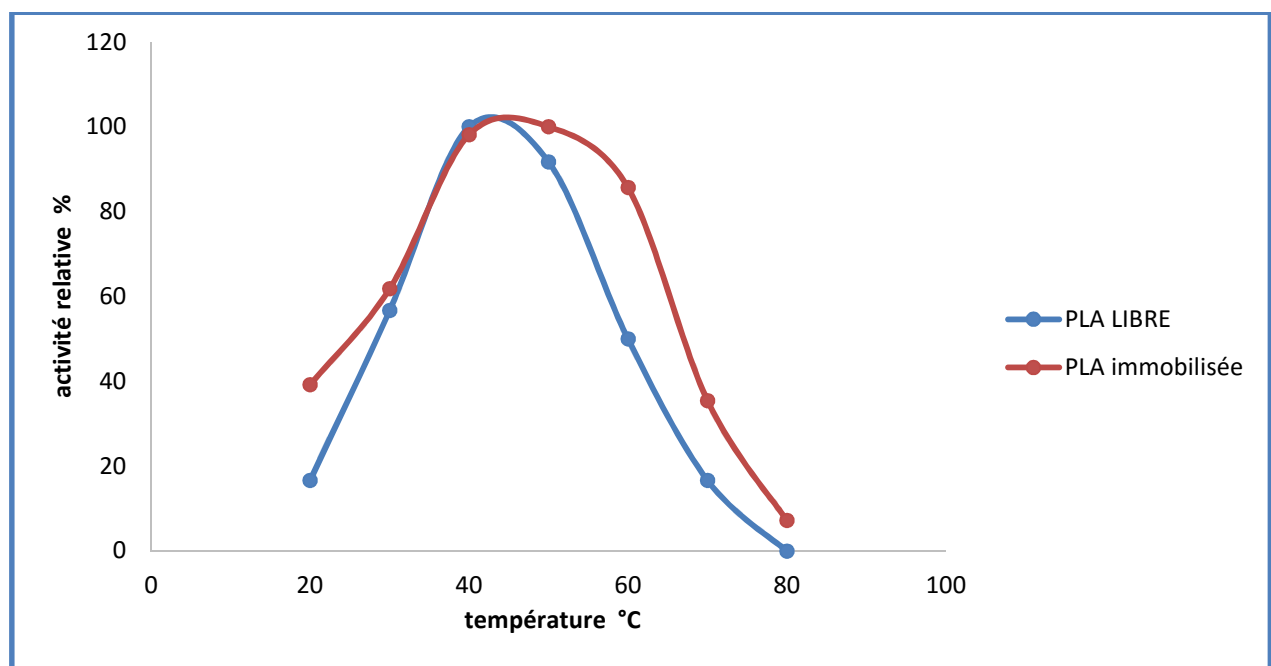


Figure 11. Effet de la température sur l'activité phospholipasique

On observe que l'activité enzymatique est dépendante de la température, comme illustrée sur la Figure 11. Les résultats montrent que la température optimale pour la PLA1 libre et immobilisée est de 40 et 50 °C, respectivement.

En outre, les résultats obtenus montrent qu'au-delà du point optimal, la PLA1 libre conserve plus de 90% de son activité initiale à la température de 50 °C. de plus la PLA1 libre garde des taux de 50 % et 17 % environ de son activité à T=60 °C à T=70°C. En effet, l'augmentation de la température supérieure au point optimal (40 °C) a entraîné une baisse des activités en raison de la dénaturation thermique de la protéine et de son instabilité vis-à-vis des augmentations de températures (**Kharrat et al., 2013**).

La PLA1 immobilisée a retenu plus de 85% de son activité initiale sur une plage de température allant de 50 °C à 60 °C. Elle conserve plus de 35 % à 70 °C. En effet, après son point optimal (50 °C) et l'augmentation de la température jusqu'à 70 °C, l'activité de la phospholipase diminue progressivement, car le procédé d'immobilisation aurait augmenté la stabilité thermique de l'enzyme. Certains auteurs préconisent, à propos de la diminution de l'activité, après le point optimum, la formation du complexe enzyme-support qui peut gêner l'accès du substrat au site actif (**Zhan et al., 2013**). Après immobilisation, la stabilité de la structure de la PLA1 peut être produite ce qui améliore ainsi sa résistance à la température. En effet, l'immobilisation de PLA1 pourrait protéger les sites actifs de PLA1 (**Sheelu et al., 2008**), (**Dianyu et al., 2012**).

Ces résultats montrent que la PLA1 immobilisée est plus stable à la variation de température.

3.4. Effet de la durée d'incubation sur l'activité lipasique de l'enzyme libre et immobilisée

L'effet de la durée d'incubation sur l'activité lipasique de la PLA1 libre et immobilisée a été déterminée à une température de 40°C et un pH de 7 de la solution tampon citrate à 0.05N sur un intervalle de temps allant de 10 à 60 min. les résultats obtenus sont repris dans la figure 12 ci-dessous.

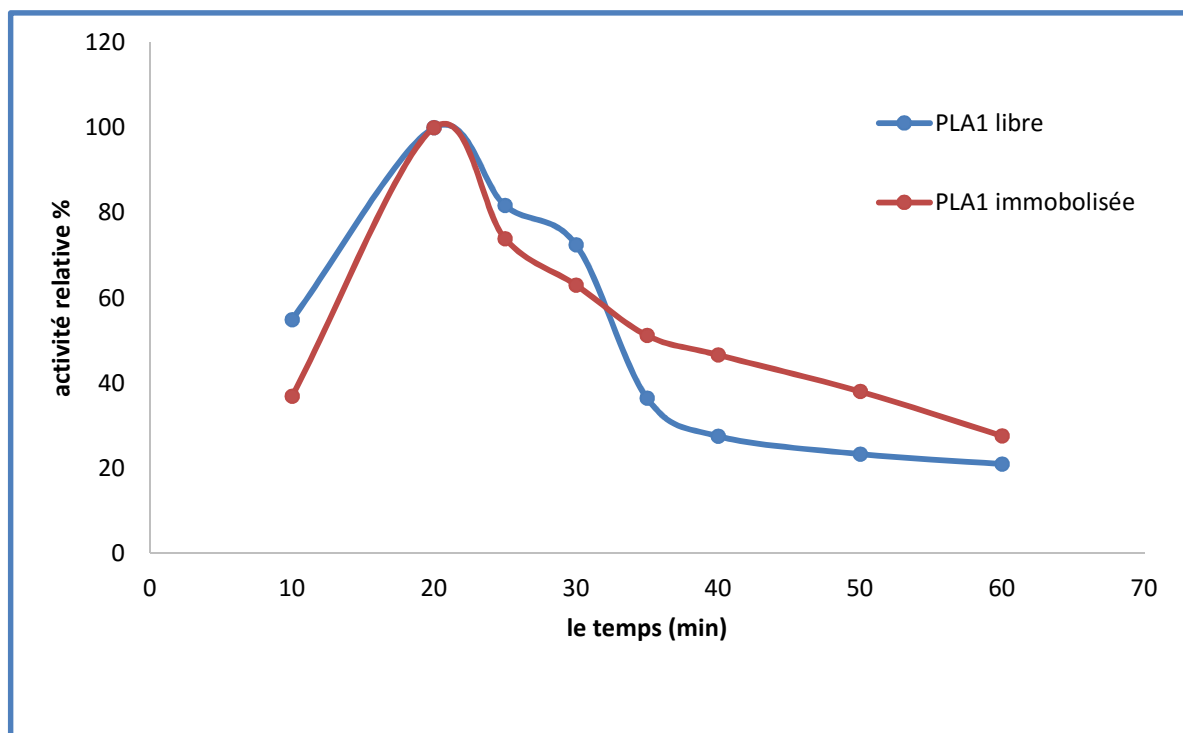


Figure 12. Effet de la durée sur l'activité lipasique de la PLA1 libre et immobilisée

Les résultats montrent que la durée d'incubation influe sur l'activité lipasique. On observe que l'optimum d'activité est atteint après une durée d'incubation de 20 minutes. C'est la durée d'incubation similaire que fixe la plupart des travaux relatifs à l'activité lipasique (**Yang et al., 2006**).

III.3.5. Effet du pH sur l'activité lipasique de la PLA1 libre et immobilisée

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 13. Ils montrent que l'activité lipasique de la PLA1 libre et immobilisée est proportionnelle aux variations du pH jusqu'à une valeur maximale égale à pH 5,5, puis elles diminuent. Ce qui suggère que le pH optimum de la PLA1 est de 5,5.

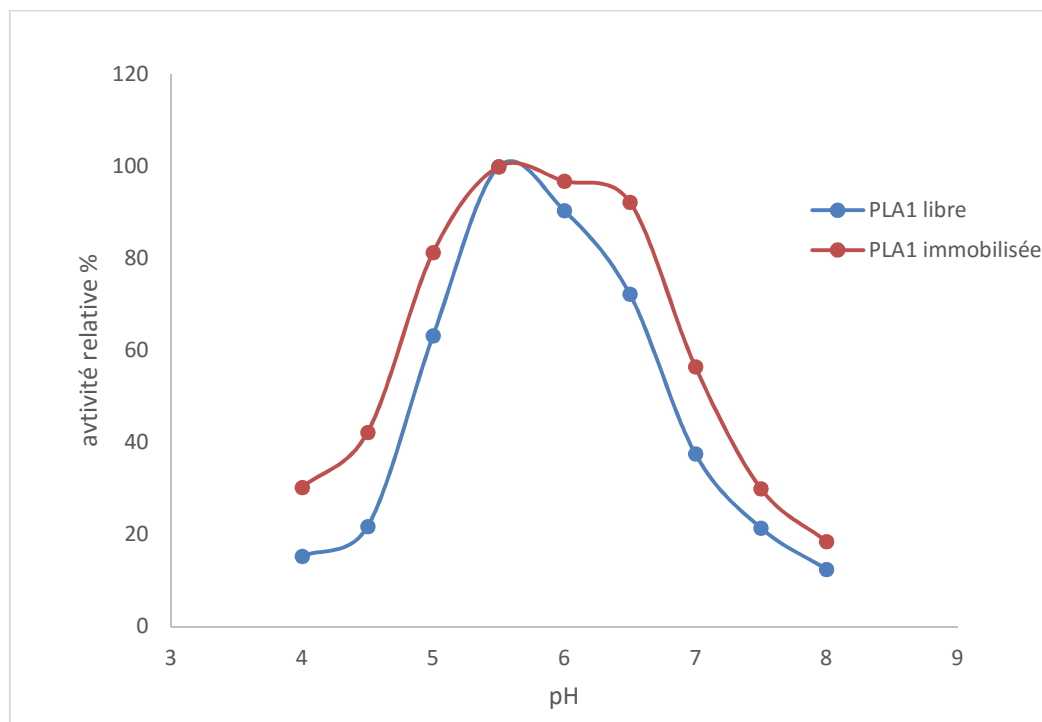


Figure 13. Effet du pH sur l'activité lipasique de la PLA1 libre et immobilisée

3.6. Effet de la température sur l'activité lipasique de la PLA1 libre et immobilisée

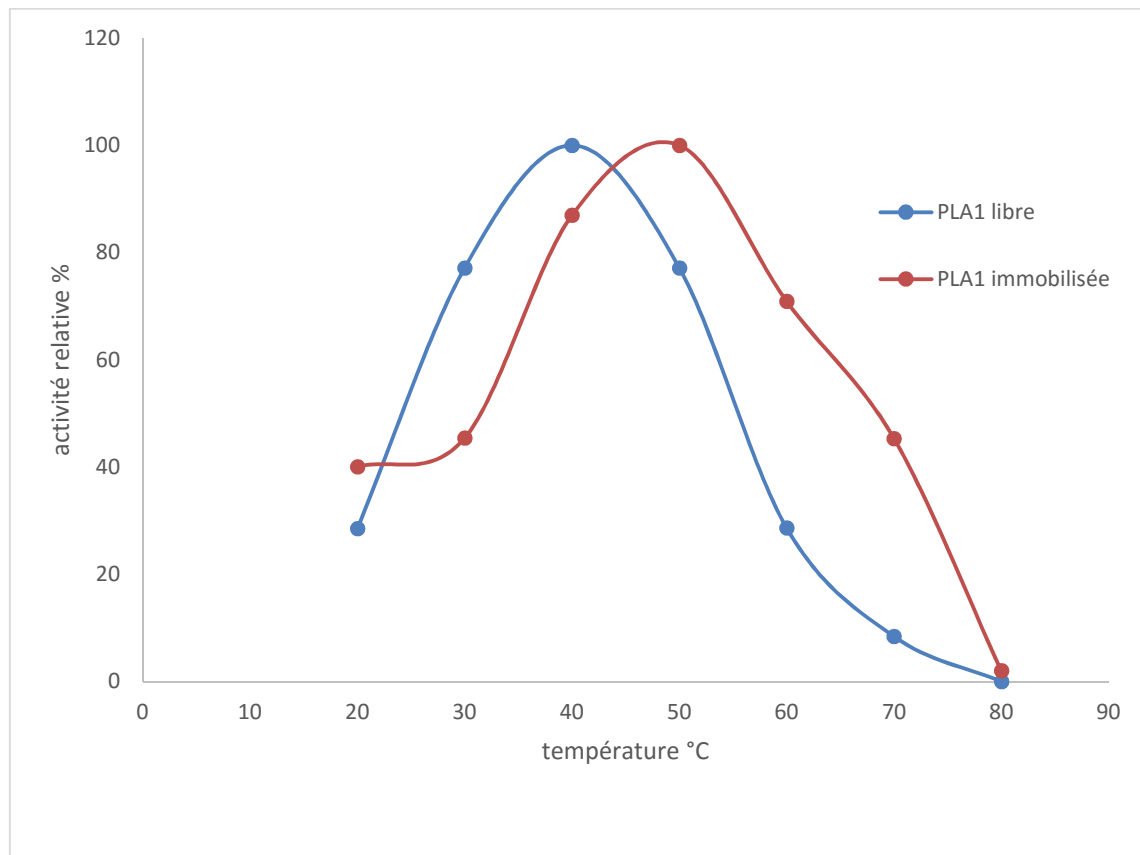


Figure 14. Effet de la température sur l'activité lipasique sur la PLA1 libre et immobilisée

Selon les résultats de la figure 14 ci-dessus, l'immobilisation déplace la température optimale de la PLA1 de 40 °C à 50 °C pour l'enzyme immobilisée sur la bentonite par adsorption. On peut stipuler que ceci est dû au mouvement limité de l'enzyme en raison de la formation d'interaction entre l'enzyme et les supports, comme il peut avoir pour origine, une faible restriction dans la diffusion du substrat aux températures élevées. Des observations similaires sont rapportées par certains auteurs qui formulent que les enzymes immobilisées gardent une activité catalytique à des températures élevées (**Dianyu et al., 2012**).

4. Comparaison entre l'activité lipasique et phospholipasique de l'enzyme

4.1. Activité lipasique et phospholipasique de l'enzyme libre

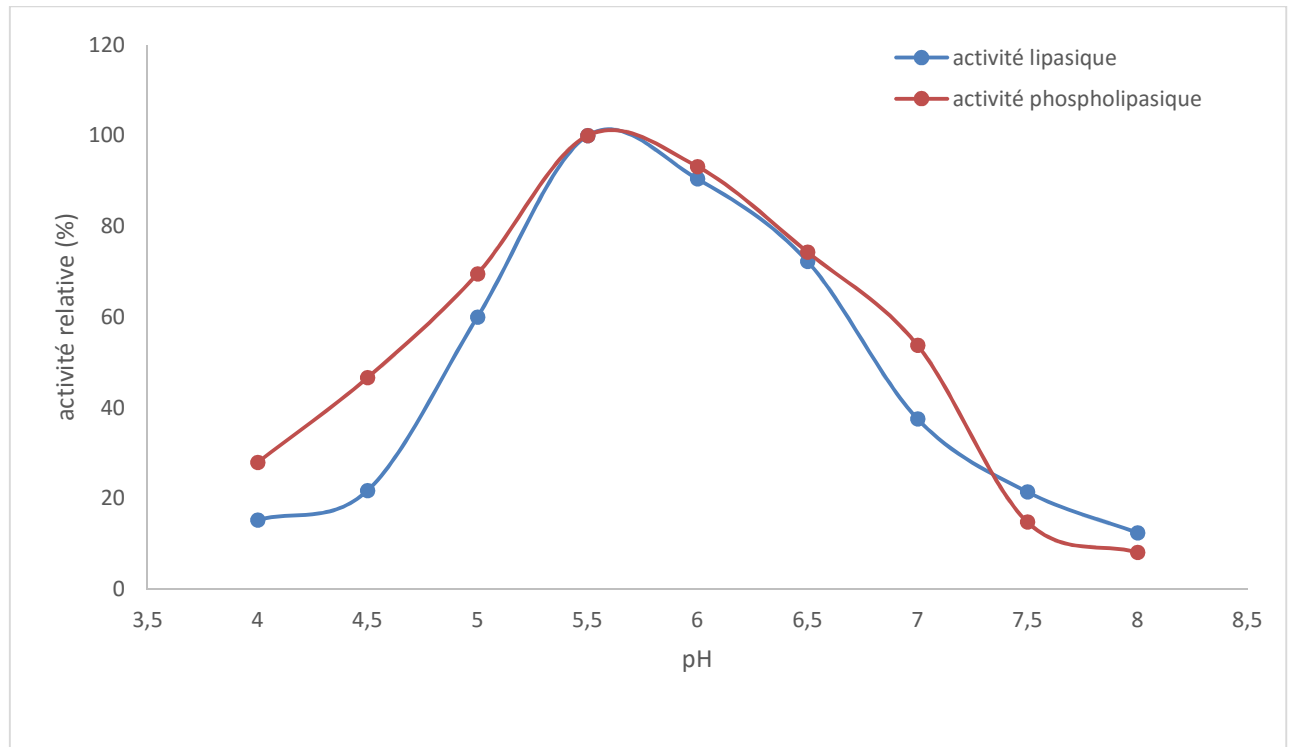


Figure 15. Evolution de l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1 libre en fonction du pH

La figure 15, représente une comparaison entre l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme libre en fonction du pH. Il est bien évident que les deux courbes représentant l'effet du pH ont la même allure. Cependant, à pH 5, la PLA1 exprime une activité phospholipasique supérieure à l'activité lipasique, des résultats similaires ont été obtenus par (Dianyu *et al.*, 2012) et (Yang *et al.*, 2006). On peut stipuler que c'est pour cette raison que le producteur (Novozymes) recommande l'utilisation de l'enzyme à pH 5 et ceci pour éviter la perte du rendement qui peut être provoqué par l'hydrolyse des TAG par l'enzyme si le procédé est opéré au-delà cette intervalle (Illanes, 2008).

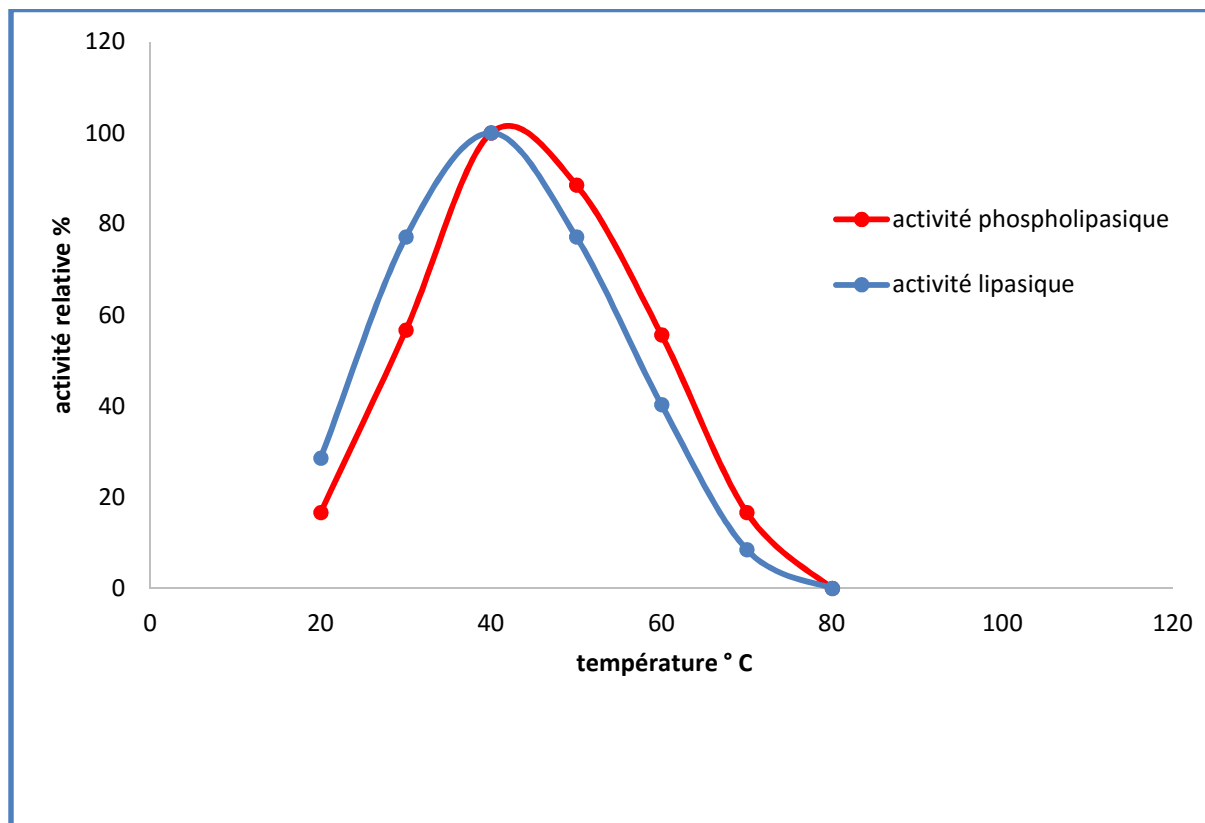


Figure 16. Évolution de l'activité phospholipasique et l'activité lipasique de la PLA1 libre en fonction de la température

En ce qui concerne la température, cette dernière nous fournit des informations concernant les deux activités (phospholipasique et lipasiques). On observe que pour des températures allant de 20 à 40 °C, l'activité lipasique domine sur l'activité phospholipasique. Mais à partir de 40 °C, l'activité phospholipasique reprend le dessus. Ces observations seraient probablement dues à la nature de la lipase qui développe son affinité dans l'un ou l'autre intervalle de température en utilisant doublement ses deux activités (activité lipasique et phospholipasique) pour éliminer les acides gras et les phosphatides contenus dans l'huile.

Par ailleurs, on peut aussi stipuler que c'est pour cette raison que le producteur (Novozymes) recommande l'utilisation de l'enzyme dans un intervalle de température entre 45-55 °C. Et ceci pour éviter la perte du rendement qui peut être provoqué par l'hydrolyse des TAG par l'enzyme si le procédé est opéré au-delà de cette intervalle (Illanes, 2008).

4.2. Activité lipasique et phospholipasique de l'enzyme immobilisée

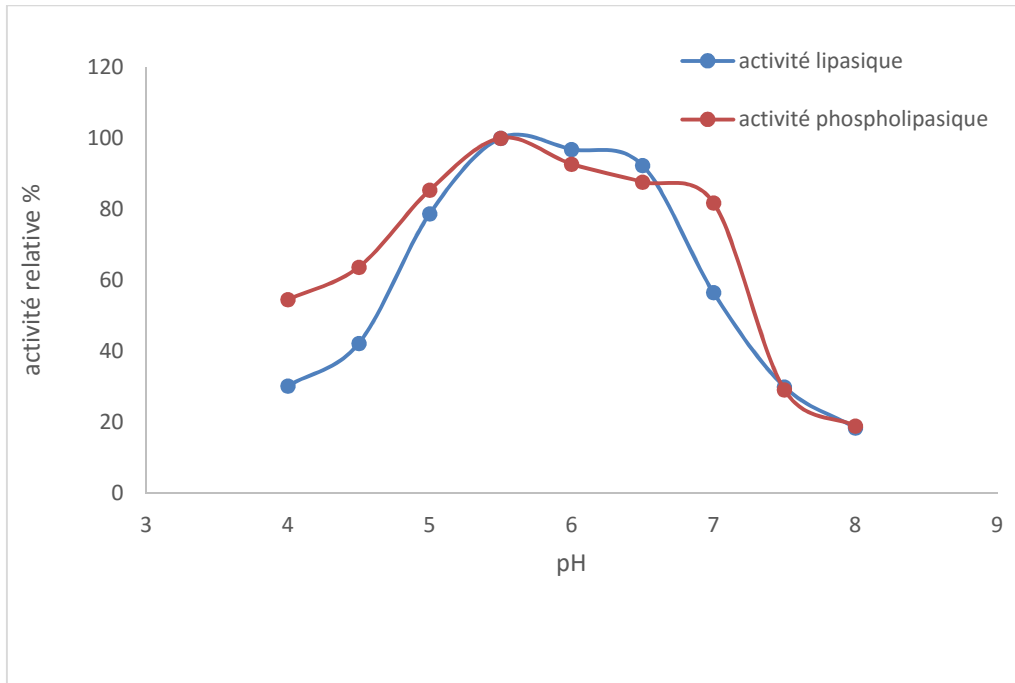


Figure 17. Évolution de l'activité lipasique et de l'activité phospholipasique en fonction Du pH

La figure 17 ci-dessus présente l'évolution de l'activité lipasique et phospholipasique de la PLA1 immobilisée en fonction du pH. Les résultats montrent qu'il y a toujours une prédominance de l'activité phospholipasique, comme rapporté par les travaux de la littérature (Yang *et al.*, 2006).

Les tracés montrent aussi l'effet de l'immobilisation sur la stabilité de l'enzyme vis-à-vis les variations du pH. (Dianyu *et al.*, 2013).

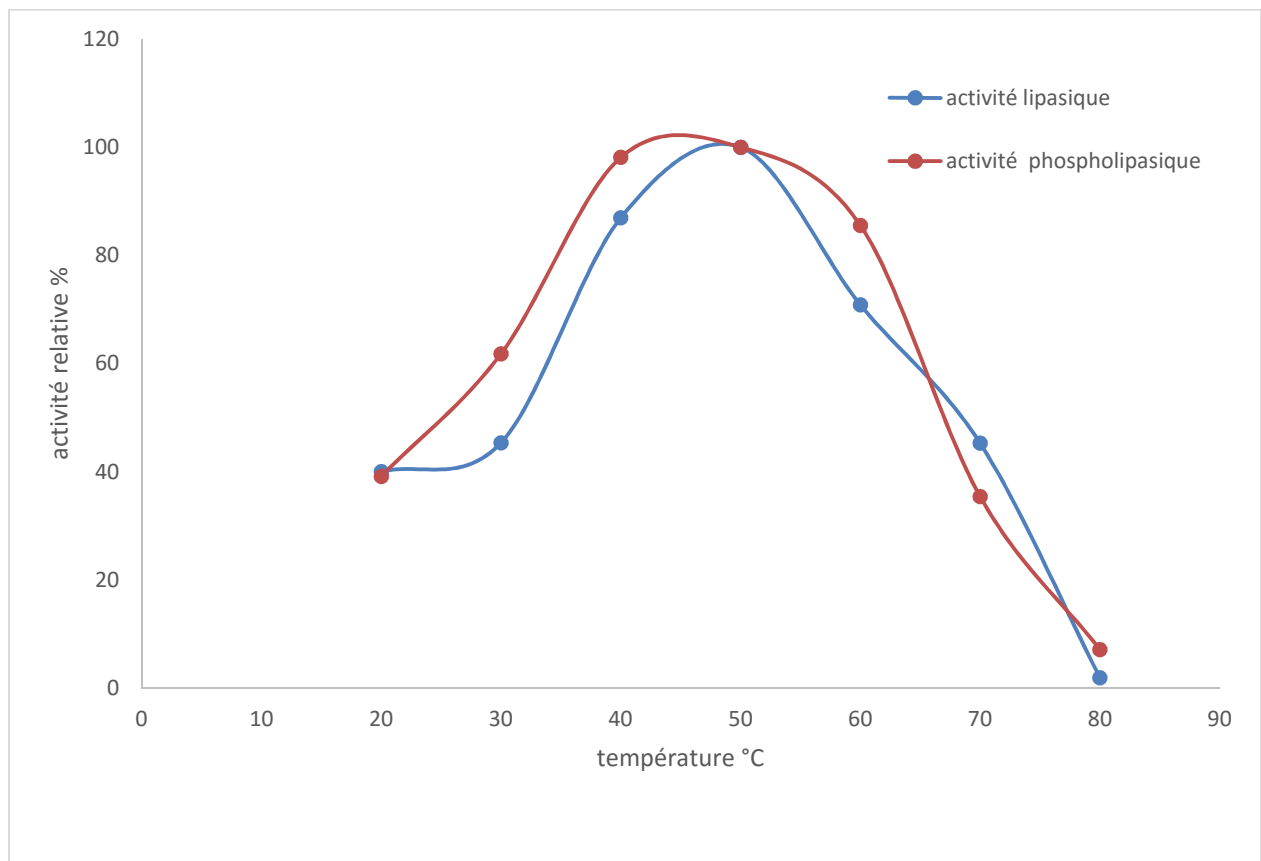


Figure 18. Evolution de l'activité lipasique et de l'activité phospholipasique de l'enzyme immobilisée en fonction de la température

La figure 18 montre que l'augmentation de la température laisse entrevoir une prédominance de l'activité phospholipasique au dépend de l'activité lipasique sur presque la totalité de l'intervalle des températures considérés.

En outre, l'immobilisation a conféré à l'enzyme une meilleure stabilité thermique vis-à-vis de ce paramètre. (**Kharrat et al, 2013**), (**Dong et al, 2012**).

5. Énergie d'activation de l'enzyme libre et immobilisée

L'énergie d'activation (E_a) exprimé en Kcal mol^{-1} ou Kj/mole représente l'énergie entre les réactifs et l'état de transition (ou complexe activé) d'une réaction donnée. E_a est donné par la loi d'Arrhenius suivante : $\ln(V) = \ln A - E_a/(RT)$, où A est une constante pour la réaction particulière, V est l'activité de l'enzyme, (T) la température en Kelvin, R la constante des gaz parfait ($R = 1.987 \text{cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ou $8,31 \text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$).

Pour les besoins de la détermination de E_a , l'activité de l'enzyme (V) a été étudiée sur une gamme de températures de 303 à 328 K et E_a a été calculée à partir de la pente ($-E_a/R$) obtenu à partir de la représentation linéaire de $\ln V$ en fonction de $1/T$.

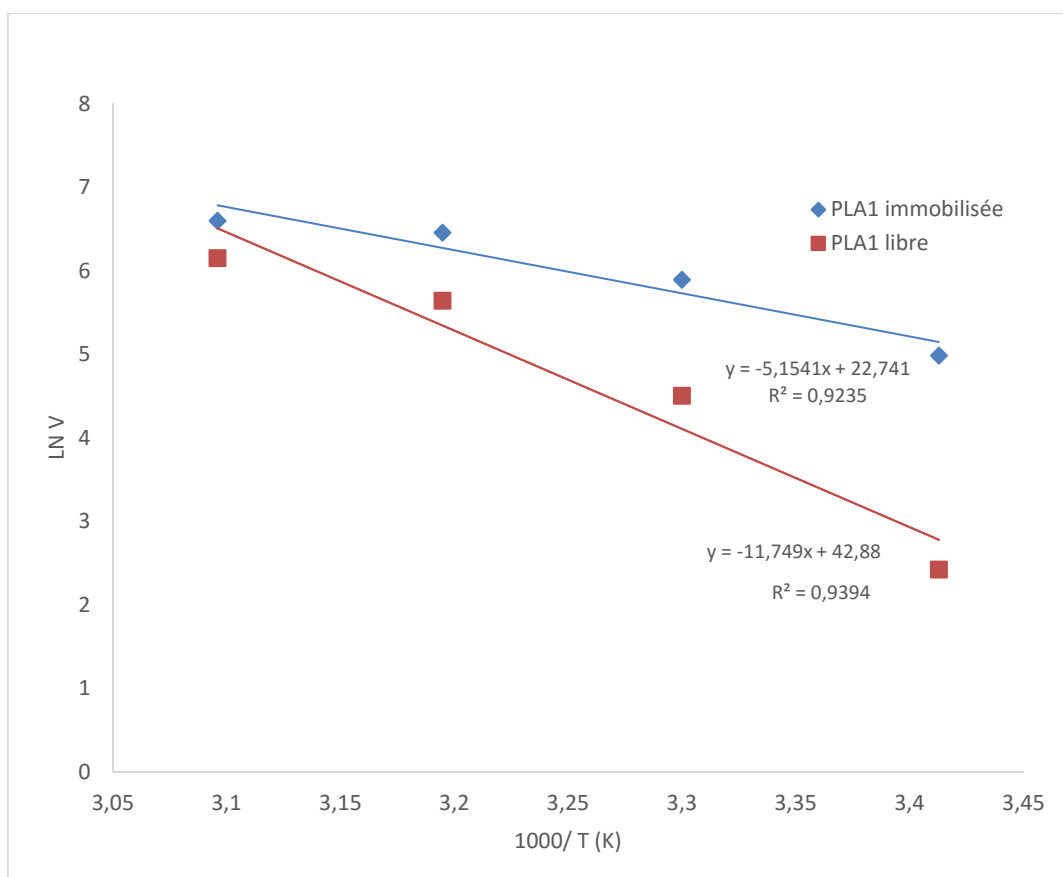


Figure 19. Représentation d'Arrhenius de l'énergie d'activation de la PLA1 libre et immobilisée

L'énergie d'activation (E_a) la phospholipase libre et immobilisée avec les équations de régression sont représentées par la figure.

A la lumière des résultats obtenus, on observe que l'immobilisation de la PLA1 a diminué l' E_a de 93.85 à 12.71 kJ mol⁻¹, ce qui a conduit à une meilleure activité catalytique de l'enzyme. Des résultats similaires sont obtenus par les travaux de la littérature. Pour ces auteurs, ce changement peut être attribué à l'augmentation du transfert de masse du substrat à partir de la solution à la surface de l'enzyme. La diminution considérable de E_a signifie aussi que la PLA1 immobilisée est peu sensible à l'augmentation de la température. (Dong *et al.*, 2012) et (Zeng *et al.*, 2009).

6. Détermination des paramètres cinétiques le l'enzyme libre et immobilisée

La comparaison de la valeur de K_m pour l'enzyme libre et immobilisée peut fournir des informations concernant les interactions entre l'enzyme et son support.

L'effet de la concentration en substrat(s) sur la vitesse de réaction initiale (v) catalysé par la PLA1 libre et immobilisées a été étudié en utilisant la lécithine de soja comme substrat.

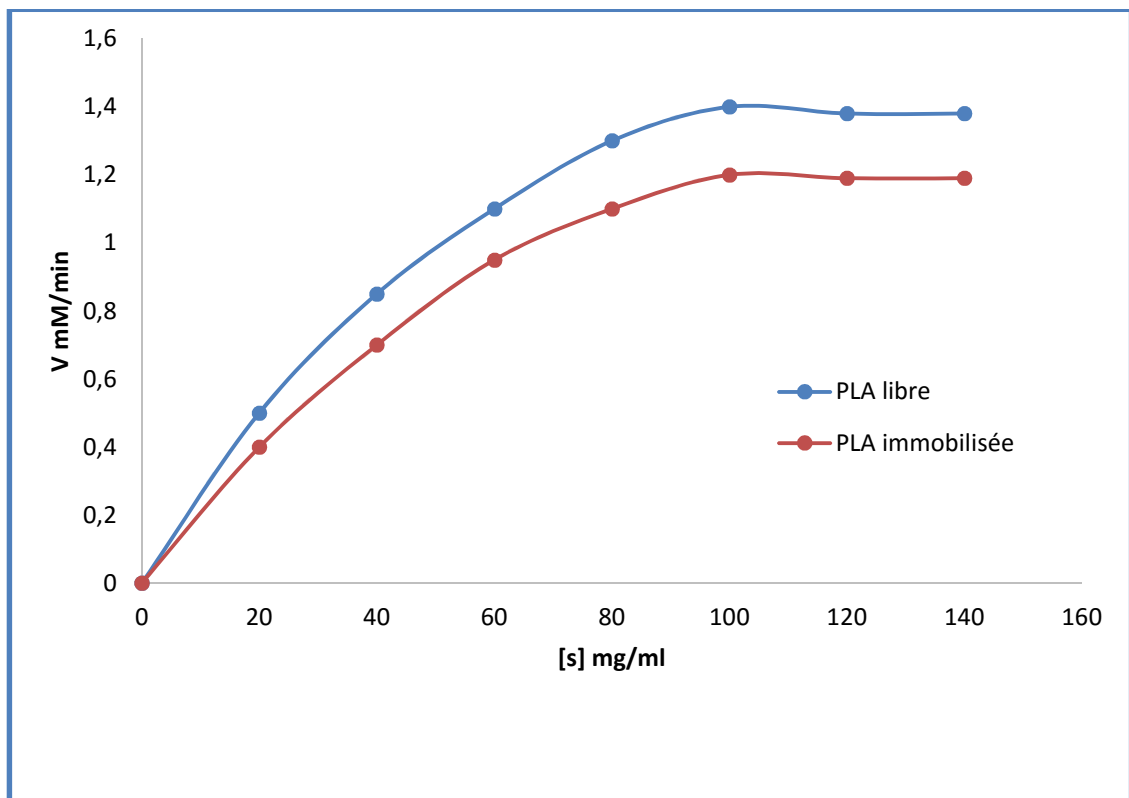


Figure 20. Représentation graphique de la cinétique de Michaelis-Menten

La constante de Michaelis (K_m) et la vitesse maximale de réaction (V_{max}) de la PLA1 libres et immobilisées ont été calculées à partir du modèle de Michaelis-Menten (Figure 21) ci-dessus et de Lineweaver-Burk (Figure 22) ci-dessous.

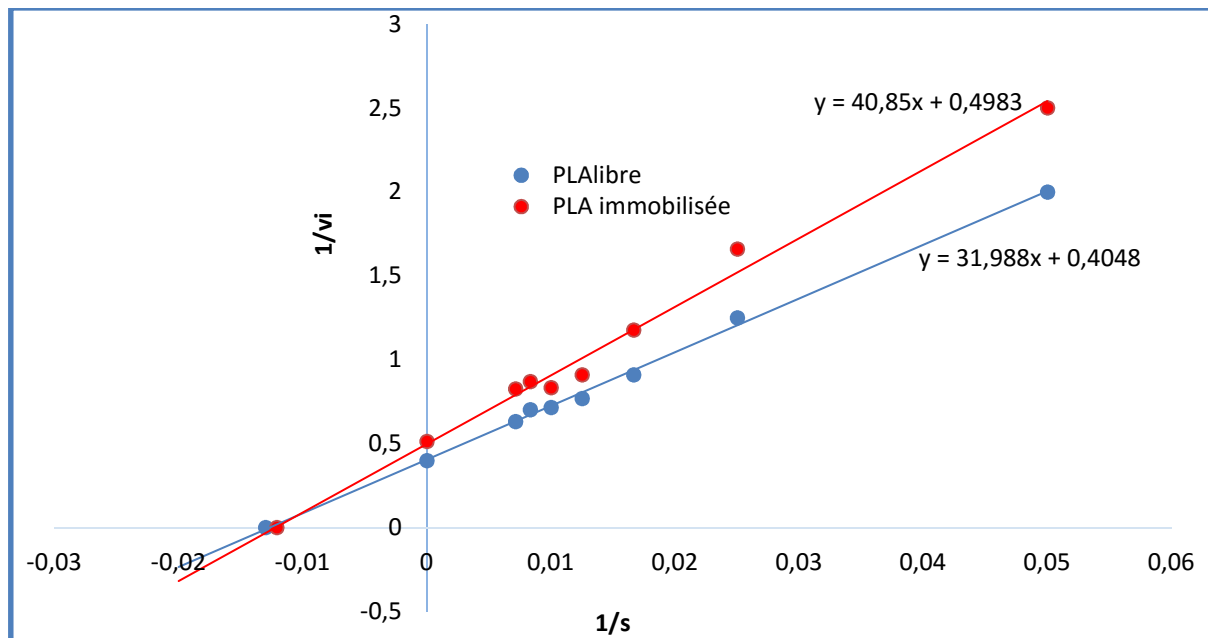


Figure 21. Représentation de Lineweaver-Burk pour les PLA1 libres et immobilisées.

Les valeurs obtenues pour V_{max} sont respectivement de 2,51 et de 1,94 mmole/min pour PLA1 libre et immobilisée et la valeur de K_m est de 75,88 pour PLA1 libres et 82,12 mg/ml pour l'immobilisée

La Comparaison de la valeur du K_m de l'enzyme libre et immobilisée nous fournis des informations au sujet des interactions entre l'enzyme et son support. La valeur de K_m pour la PLA1 immobilisée est légèrement plus élevée que PLA1 libre. Une augmentation en K_m une fois qu'une enzyme est immobilisée, indique une diminution de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, qui selon certains auteurs pourrait être provoqué par :

- Le phénomène stérique des sites actifs produit par le support
- la perte de flexibilité de l'enzyme nécessaire pour lier le substrat
- la résistance à la diffusion du substrat près des particules du support. (Zeng *et al.*, 2009)

Les résultats ont montrés que l'affinité de la PLA1 immobilisée vis-à-vis de la lécithine était plus petite par rapport à PLA1 libre, c'est-à-dire que l'activité de la PLA1 immobilisée est plus basse que l'activité de PLA1 libre.

Le changement des constantes cinétiques peut être dû aux changements structurels dans l'enzyme par le procédé d'immobilisation ou à la difficulté d'accessibilité du substrat aux sites actifs de l'enzyme immobilisée. (**Kharrat *et al.*, 2011**)

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

La réaction catalysée par la PLA1 s'est produite exclusivement à l'interface de lipide-eau, ainsi il est important de créer des surfaces élevées pour la réaction du processus de dégomme de l'huile.

La teneur initial en phosphore dans l'huile brute de soja est de 195 mg/kg. La température et la valeur du pH ont été maintenues dans l'intervalle 50-55 °C et 5.5 respectivement. Ceci permettrait de réduire au minimum la désactivation thermique des enzymes, et la conservation de la vitesse maximale de réaction. Les résultats représentant les taux de phosphore en fonction du temps d'hydrolyse sont représentés dans la figure 23.

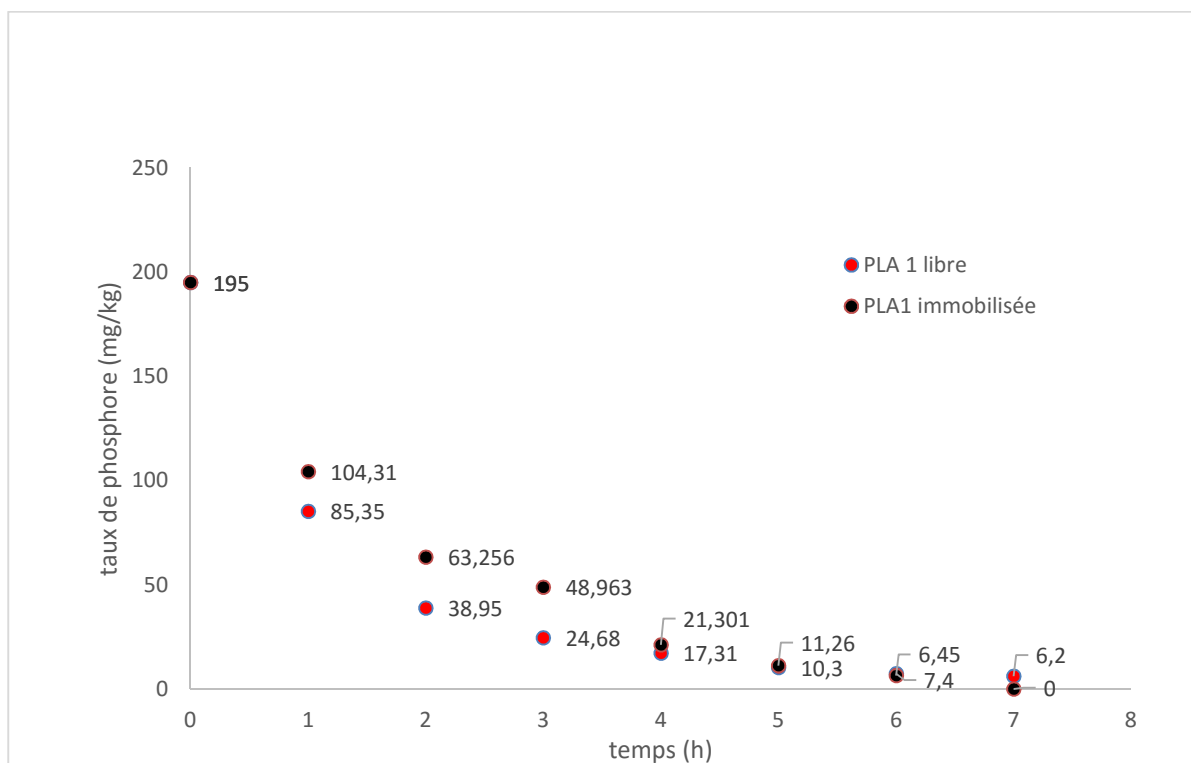


Figure 22. Variation du taux de phosphore dans l'huile traitée par l'enzyme libre et immobilisée

La PLA1 libre a exhibé un fort déclin dans la teneur en phosphore après un temps d'incubation qui a atteint 6.2 mg/kg après 7 h d'incubation. Tandis que dans le cas de la PLA1 immobilisée la teneur du phosphore été à l'état de trace après 7h d'incubation.

Les résultats indiquent que la teneur en phosphore résiduelle a été réduite par la PLA1 libre de 195 ppm à 10.3 ppm après 5 heures d'incubation. Il faudrait 6 heures d'incubation à l'enzyme immobilisée pour diminuer la teneur en phosphore à 6.45 ppm (valeur en dessous de la norme de 10 ppm). La teneur en phosphore après 7 h d'incubation a été réduite à l'état de trace par la PLA1 immobilisée.

Bien que la PLA1 libre soit plus efficace vis à vis de l'hydrolyse des phospholipides comparativement à la PLA1 immobilisée, cette dernière disposerait plus d'avantage.

Des temps d'incubations similaires (4-5 h pour l'enzyme libre) et 7 h pour l'enzyme immobilisée) sont obtenus par de nombreux auteurs ayant travaillé sur le dégomme de l'huile par la phospholipase PLA1 (**Dianyu et al., 2012 et 2013**).

Dianyu et al., 2013, utilisant la PLA1 libre et immobilisé sur des particules ferromagnétiques a réduit les teneurs en phosphore de 138 ppm à 8.7 mg/kg avec la PLA1 libre (pH 5, T= 50 °C) à 7 ppm après 7 h avec la PLA1 immobilisée (pH 6, T= 55 °C). Dans une autre étude

(**Dianyu et al., 2012**), le même auteur a pu réduire la teneur en phosphore résiduelle de 142.2 mg/kg à 10.4 ppm et de 10.1 ppm après 3 h et 7 h avec la PLA1 libre et immobilisée sur le calcium alginate respectivement. Les valeurs de la température et du pH sont maintenues entre 50–58 °C et pH 5.5–6.0.

(**Xiaofei et al., 2014**) a appliqué la phospholipase A1 (Lecitase Novo) libre pour réduire la teneur de phospholipide dans l'huile de colza à une teneur en phosphore inférieure à 10 mg/kg, sous les conditions de 5 h de durée, de pH 5 et 50 °C pour la température. (**Yang et al., 2006**) a employé la phospholipase A1 microbienne de *Thermomyces lanuginosus*/*Fusarium oxysporum* dans le dégommage de l'huile de soja pour atteindre un taux de phosphore à moins de 10 mg/kg (6.3 h, de pH 4.8-5.1). (**Zhan et al., 2013**) a obtenu avec une PLA1 libre et purifiée un taux de phosphore de 7 mg/kg après un temps de réaction de 3h. (**Yang et al., 2008**) a appliqué la phospholipase A1 dans le dégommage d'une huile de soja et il a pu atteindre des taux de phosphore inférieure à 10 mg/kg.

(**Gofferjé et al., 2014**) a pu atteindre des taux de 4 mg/kg après 3 h de réaction à une température de 50°C et un pH de 5.

Daniela et al., 2014 a obtenu un taux de phosphore de 3mg/kg dans le dégommage d'une huile de tourne sol par une phospholipase A1.

Conclusion

Le travail réalisé est une immobilisation de la phospholipase A1 sur une bentonite modifiée par le Bromure de Cetyl Triméthyl Ammonium (CTMAB) et son application dans le dégommeage des huiles alimentaires.

Le matériau après avoir subi la modification par le CTMAB et l'immobilisation de la PLA1 sur celui-ci a été caractérisé par la méthode infrarouge. Les résultats des spectres de la caractérisation FTIR (présence de pics 2854 cm^{-1} et 2932 cm^{-1} pour le CTAMB et 1650 cm^{-1} pour l'enzyme) obtenus montrent que l'immobilisation a bien eu lieu.

L'analyse des protéines nous a montré que nous avons pu atteindre un taux d'immobilisation de 85 % de l'enzyme sur le support.

Nous avons observé aussi que l'immobilisation avait un effet significatif sur l'efficacité de la PLA1, En effet, même si l'immobilisation n'avait pas d'effet sur le pH optimum de l'enzyme, estimé à 5.5, l'optimum de la température s'est déplacé de 40 à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour l'activité phospholipasique. Contrairement à PLA1 libre qui n'a pas eu d'effet sur le pH optimum ainsi que sur l'optimum de température.

Un autre résultat a été mis en évidence et qui concerne l'activité phospholipasique de la PLA1 qui prédomine toujours vis-à-vis de l'activité lipasique. La PLA1 présente une forte activité phospholipasique et lipasique, qu'elle soit libre ou immobilisée.

L'énergie d'activation de l'enzyme est de $93.856\text{ kJ mol}^{-1}$ pour l'enzyme libre et est de $12.719\text{ kJ mol}^{-1}$ pour l'immobilisée. L'immobilisation a donc réduit l' E_a .

Le taux de phosphore a été mesuré après 7 h d'incubation pour la PLA1 libre et immobilisée et les résultats sont de 6.2 mg/ kg pour l'enzyme libre et en états de trace pour l'enzyme immobilisée.

Les résultats obtenus dans ce travail montrent que l'immobilisation des enzymes possède un potentiel prometteur d'être appliquée à l'échelle industriel.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents :

*Vous avez comblés ma vie de tendresse,
D'affection et de compréhension.*

A mes sœurs adorées : Sabrina et Emily

*A tonton Djamel « Azouzou » pour son soutien
tout au long de mon parcours universitaire*

A Mes grandes mères.

A mes oncles, mes tantes et à tous mes cousins.

*A mes amis (es), et à toute la promotion
« Biotechnologie Microbienne 2015 »*

De omni re scibili, et quibusdam aliis

Sihem

A

- AOCS C. (1997). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, Ca 12-55.

B

- Besq A, Malfoy C, Pantet A, Monnet P et Righi D. (2003). Physicochemical characterisation and flow properties of some bentonite muds. *Applied Clay Science*. **23**, 275-286.
- Bergaya F. (2006). *Handbook of Clay Science: Developments in Clay Science*, 1. Elsevier Ltd.
- Buchholz K, Kasche V et Bornscheuer U. (2005). *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Bradford M, A. (1976). Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding : *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-254.

C

- Cahuzac-Picaud. (2010). Les huiles végétales, intérêt diététique et gastronomique : phytothérapie *springer* .**8**, 113-117
- Copeland R. (2000). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* 2nd edn. Wiley.
- Cai F, Yang Z, Huang J, Zeng G, Wang L et Yang J. (2014). Application of cetyl trimethyl ammonium bromide bentonite–titanium dioxide photocatalysis technology for pretreatment of aging leachate. *Journal of Hazardous Materials* .**275**, 63–71.

Références bibliographique

- Chang M-Yet Juang R. (2005).Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan–clay composite immobilized enzymes: Enzyme and Microbial Technology. **36**, 75–82.

D

- Daniela L, Lamas, Guillermo H, Crapiste, Diana et T Constenla. (2014). changes in quality and composition of sunflower oil during enzymatique degumming process. Food science and technology.**58**, 71-76.
- De Kock J, De Greyt W, Gibon V etKellens M. (2005). Développements récents en matière de raffinage et de modifications : élimination des contaminants dans les huiles alimentaires et réduction du taux d'acides gras *trans.ocl* vol. **12**, n° 5-6 septembre-décembre.
- Dianyu Yu, Lianzhou J, Zhenlan L, John S, Jun X et Yukio K. (2012). Immobilisation of phospholipase A1 and its application in soybean oil degumming. Journal of the American Oil Chemists' Society **89**, 649-656.
- Dianyu Y, Ying M, Lianzhou J, Walid E, Min S et Lizhi H. (2013). Optimisation of magnetic immobilized phospholipase A1 degumming process for soybean oil using response surface methodology. Journal of the American Oil Chemists' Society.**237**, 811-817.
- Dianyu Y, Ying M, Sophia J, Xue, Lianzhou J et John S. (2013). Characterisation of immobilized phospholipase A1 on magnetic nanoparticles for oil degumming application. Food science and thechnology **50**, 519-525.
- 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**, 9-15.
- Dong H, Li J, Li Y, Hu L et Luo D. (2012). Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite. Chemical Engineering Journal 181-182, 590-596

G

- Ghiaci M: Enzyme immobilization. (2009). Part 2: Immobilization of alkaline phosphatase on Na-bentonite and modified bentonite. *Applied Clay Science*.**43**, 308–316.
- Guisan J. (2006). *Immobilization of enzymes and cells* 2nd edn. Humana Press.
- Guo Z, Vikbjerg A et Xu X. (2005). Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnology Advances* .**23**, 203–259.
- Grim R, Guven N. (2011). *Bentonites Geology, mineralogy, properties and uses*. Elsevier Science.
- Gofferjé G, Motulewicz J, Stabler A, Herfeller T, Foter E et Weiz U. (2014). Enzymatic degumming of crude jatropha oil : Evolution of impact factors on removal of phospholipids. *Journal of the American Chemical Society* .**10**, 11746-014-2559

I

- Illanes A, Fernandez R, Guisan M et Wilson J. (2008). Heterogeneous Enzyme Kinetics. In : *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer Science 155 – 203.

J

- Jesionowski T, Krajewska B et Zdzarta J. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: a review.**20**, 801-821.

K

- Kiransan M, Soltani R, Hassani A et Karaca A. (2014). Preparation of cetyl trimethyl ammonium bromide modified montmorillonite nano material for adsorption of a textile dye. *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers* .**45**, 2565-2577.

Références bibliographique

- Kharrat N, Ben ali Y, Marzouk S, Gargouri Y et Chaabouni M. (2011). Immobilisation of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption : comparaison with the free enzyme. *Process Biochemistry* .**46**, 1083-1089

L

- Luckham P et Rossi S. (1999). Colloidal and rheological properties of bentonite suspensions *Adv. Colloid Interface Sc* .**82**, 43-92.
- Liu N, Wang Y, Zhao Q, Cui C, Fu M et Zhao M. (2012). Immobilisation of lecitase® ultra for production of diacylglycerols by glycerolysis of soybean oil. *Food Chemistry* .**134**, 301-307.
- Liu S, Hua L, Sun W, Wang X, Chen Z, Xu J, Ju H et Chen H. (2011). Photoinduced electrochemical preparation of Prussian blue film and electro chemical modification of the film with cetyl trimethyl ammonium cation. *Electrochimica Acta* 4007-4014.

M

- Miletia N, Bos C et Loos K. (2009). Immobilization - A route for improving enzyme performance. In : *Polymeric Materials*. Research Signpost 131–153.

N

- Nielsen M et Cowan D. (2003). *Lecitase Ultra: Enzymatic Degumming Manual*. Novozymes.

P

Références bibliographique

- Parmentier M, Guillemin S, Barbar R, Linder M et Fanni J. (2004). De nouveaux procédés d'extraction des huiles pour des produits finis de haute qualité. *Oilseeds and Fats Crops and Lipids* . vol.**11**, n° 6 novembre-décembre.

S

- Secundo F, Miehé-Brendlé J, Chelaru C, Ferrandi E et Dumitriu E. (2008). Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Microporous and Mesoporous Materials* .**109**, 350–361.
- Sheelu G, Kavitha G et Nitin W. (2008). Efficient Immobilization of Lecitase in Gelatin Hydrogel and Degumming of Rice Bran Oil Using a Spinning Basket Reactor. *Journal of the American Oil Chemists' Society* .**85**, 739–748.
- Scherer R , Oliveira J V Pergher S et Oliveira D. (2011). Screening of supports for immobilization of commercial porcine pancreatic lipase. **14**, 4
-

T

- Tanaka A. (1993). *Industrial application of immobilized biocatalysts*. Dekker.
- Trevan M. (1988). *Enzyme Immobilization by Adsorption*. In : *New Protein Techniques*. Springer 481–489.

V

Références bibliographique

- Vincent G, Alexandra B, Sigrid G, Reidun S, Bjørnar S, Bertus B et Gert V. (2004). Rational engineering of enzyme stability. *Journal of Biotechnol* .**113**, 105-120.

X

- Xiaofei J, Chang M, Xiaosan W, 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**, 142-148.
- Xiaofei J, Chang M, Xiaosan W, Jin Q et Wang X. (2015). A comparative study of phospholipase A1 and phospholipase C on soybean oil degumming ; Application of phospholipase and phospholipase C in the degumming process of different kinds of crude oils. *Process Biochemistry* .**50**, 432-437.

Y

- Yang B, Wang W et Yang J. (2006). Optimazition of enzymatic degumming process for rapeseed oil. *Schools of Bioscience and Bioengineering and Light Industry and Food Engineering*.**83**, 7.
- Yang B, Zhou R, Yang G, Wang Y et Wang W. (2008). Insight into the Enzymatic Degumming Process of Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* .**85**, 421–425.
- Yang J, Wang Y, Yang B, Mainda G et Guo Y. (2006). Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase. *Food Technology and Biotechnology* .**44**, 101.

Z

- Zhan J, Jiang S, Pan L et Zhang Y. (2013). Purification, characterisaion and application of a coldadapted phospholipase A1 from *Bacillus cereus* SP.AF-1. *School of Biothechnologie and Food Engineering*.**4**, 3972-3976.

ANNEXES

Annexe1

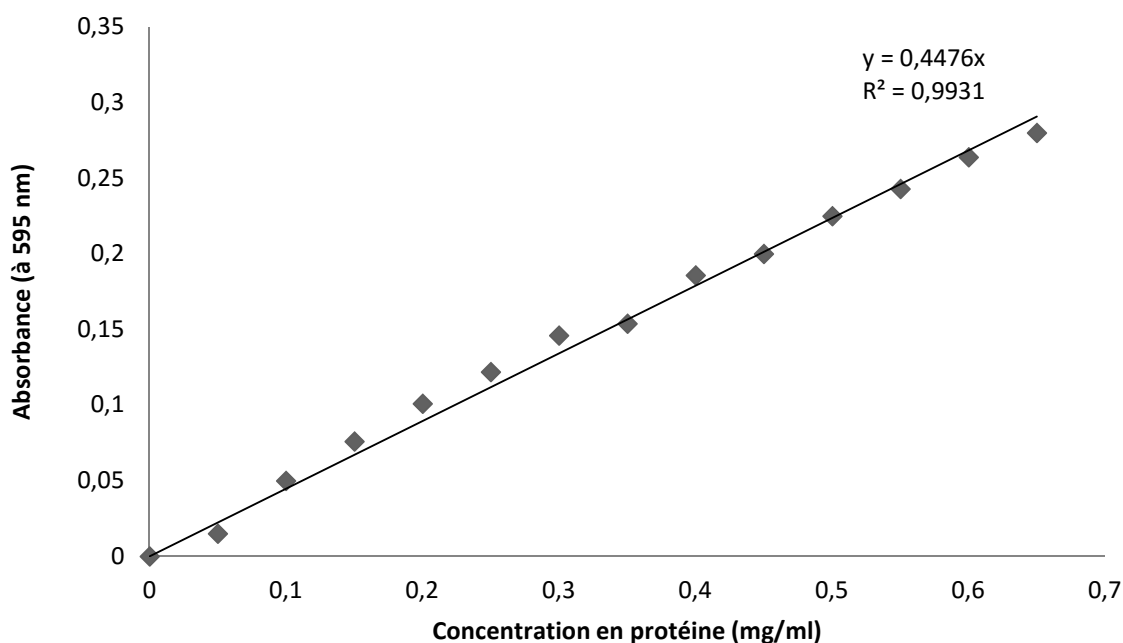
La courbe d'étalonnage est réalisée par une solution de BSA à différentes concentrations comme le montre le tableau suivant

tube	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BSA 1 mg/ml (volume de 100µl)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Eau distillé	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
5ml du Réactif de Bradford pour tous les tubes											

➤ Préparation du réactif de Bradford

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 (H₃PO₄) (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.

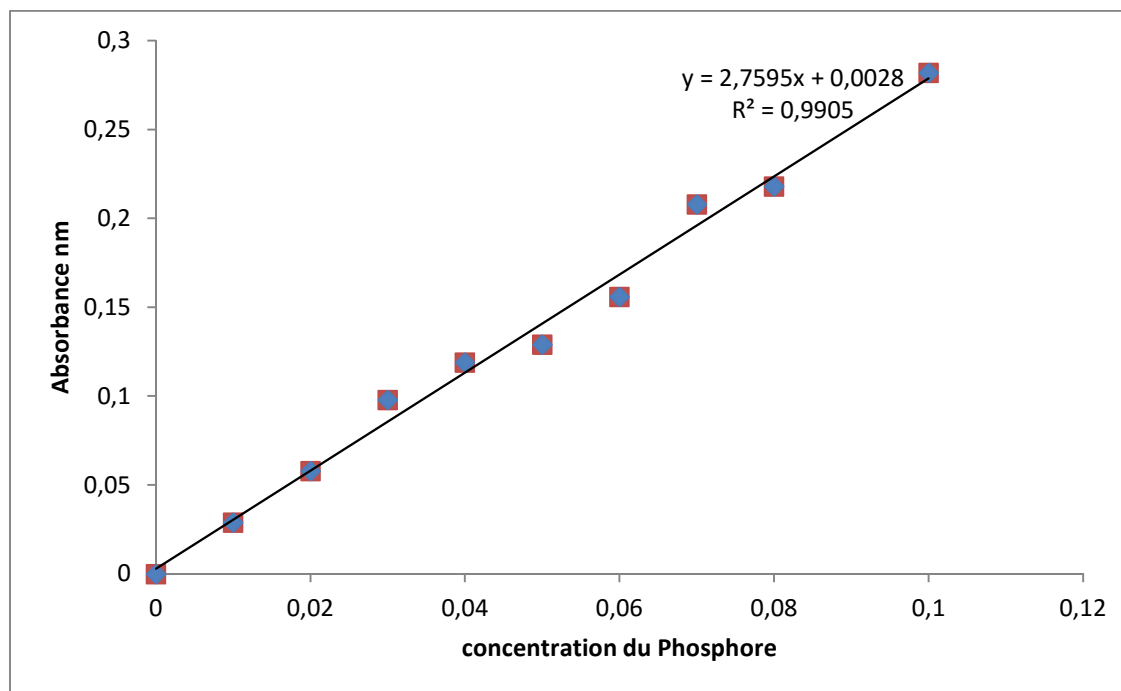
➤ Courbe d'étalonnage



ANNEXES

Annexe 2

➤ Courbe d'étalonnage des phosphores



Annexe 3

➤ Préparation des solutions tampon citrate à différentes valeurs de pH

pH	Na ₂ HPO ₄ (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

ANNEXES

Annexe 4

Classification des supports d'immobilisation des enzymes

Support pour Enzyme			
Soluble	Insoluble		
Dextrine Alcool polyvinylique	Inorganique	Organique	
	Silice, terre (bentonite), verre poreux, gel de silice.	Naturel	Synthétique
		Chitine, Amidon, Alginate, Cellulose, Agar.	Polyacrylamide, Polystyrène, Silicone, Résine échangeuse d'ion.

Annexe 5

➤ **Matériels et réactifs utilisés**

- ❖ La verrerie utilisée : des fioles, éprouvette, béchers, pipettes (1 à 10 ml), burette, Erlen Mayer, tubes à essai, ballons. Barreau magnétique
- ❖ Matériels utilisés
 - Spectrophotomètre.
 - Plaque chauffante et agitatrice (VENP SCIENTIFICA).
 - centrifugeuses (HETTICH ZENTRIFUGEN) et (sigma).
 - Four pasteur
 - Bain marie
 - Papier wattman
 - Thermomètre
 - pH mètre
 - spectrophotomètre infrarouge (IRAFFINITY-1 SHIMADZU)
- ❖ Réactifs et produits utilisés
 - PVA (BIOCHEM) $(\text{CH}_2\text{CHOH})_n$
 - HCL (PANREAC)
 - CTMAB surfactant cationique $\text{C}_{16} \text{H}_{33} (\text{CH}_3)_3\text{NBr}$ (Sigma)
 - Sulfate d'hydrazine (BIOCHEM)
 - Huile d'olive (AMIZOUR)
 - Lécithine de soja (CEVITAL)
 - NaOH (BIOCHEM)
 - Na Cl (BIOCHEM)
 - Bleu de Coomassie (BIOCHEM)
 - Acide sulfurique (BIOCHEM)
 - Ethanol(BIOCHEM)
 - eau distillé
 - acide phosphorique (H_3PO_4) (BIOCHEM)
 - phénolphtaléine (BIOCHEM)
 - BSA (BIOCHEM)
 - Oxyde de zinc (BIOCHEM)

ANNEXES

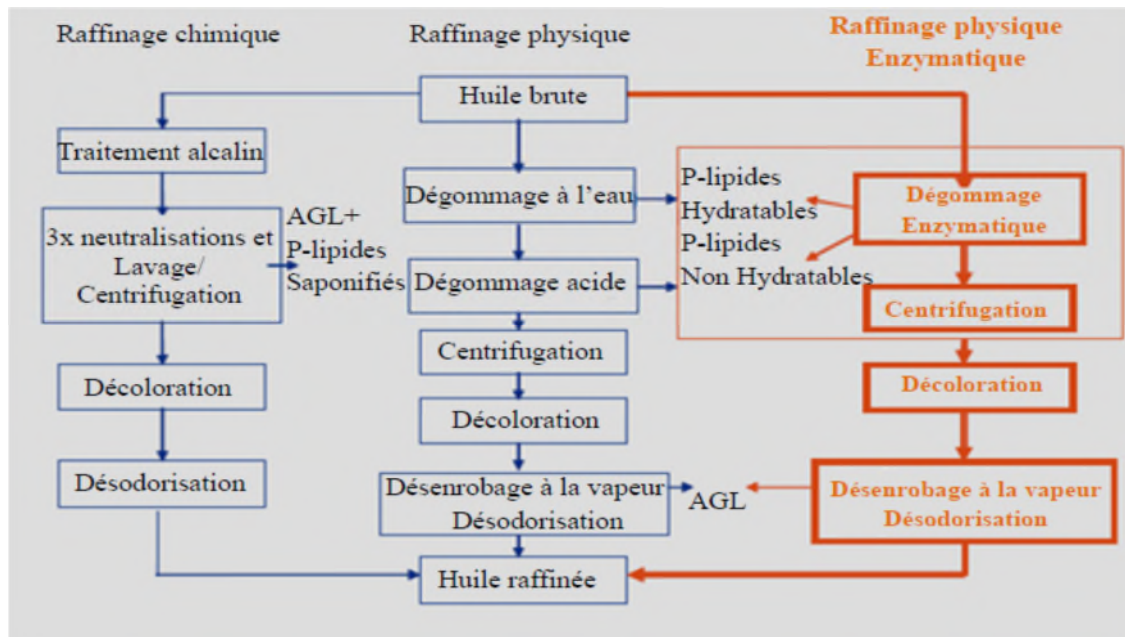
- Molybdate de sodium (BIOCHEM)
- KBr Bromure de potassium

Annexe 5

- Préparation du support pour l'immobilisation
5 g de bentonite + 2 g de CTMAB dans 100 ml d'eau distillé

Annexe 6

Figure1. Principale type et étape du raffinage



*MATERIELS ET
METHODES*

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

*RESULTATS ET
DISCUSSION*

CONCLUSION

INTRODUCTION

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

ANNEXES

Partie pratique