

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université A. MIRA - Béjaïa -

Faculté des Sciences Exactes

Département de Chimie

Mémoire de Master

Présenté par :

DERRADJI Mohand

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Chimie

Spécialité : Analyse

Suivi des *paramètres* physicochimiques d'une enzyme libre et immobilisée ; application dans le raffinage d'une huile alimentaire

Soutenu le : 18 Septembre 2013

Devant le jury composé de :

| | | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------|
| Dr BOUROUINA Mustapha | Université de Bejaia | President |
| Dr MOUSSACEB Karim | Université de Bejaia | Examineur |
| Mme MAMMERI-MEZITI Chafika | Université de Constantine | Examinatrice |
| Dr BOUKERROUI Abdelhamid | Université de Bejaia | Encadreur |

2012-2013

Dedicaces

A la mémoire de ma mère,

A mon père,

A ma femme, et na zahra

A ma raison de vivre et sources de motivations qui sont

Mes deux fils Yahia et Aymer.

*La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand
tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi.*
Albert Einstein

Remerciement

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur Abdelhamid BOUKERROUI, avec qui j'ai eu le grand plaisir de travailler tout au long de ce mémoire, à qui j'exprime mes profonds remerciements et reconnaissances pour sa patience et sa compréhension.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur KERNANI R., doctorant à l'université de Bejaia, pour son soutien, son enthousiasme et ses conseils avisés, à travers nos discussions qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à tous les membres du jury,

Monsieur M. BOUROUINA Mustapha docteur à l'Université de Bejaia pour l'honneur qu'il ma fait en acceptant d'examiner et de juger ce travail.

Monsieur, Karim Moussaceb, docteur à l'université de Bejaia qui m'a fait l'honneur d'accepter, d'examiner et de juger ce travail.

Madame Mammeri, maitre assistante A à l'université de Constantine, pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur TOUATI Abdelaziz, professeur à l'université de Bejaia, de m'avoir aidé, soutenu et encouragé tout au long de mon cursus de Master

Je remercie également tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail en particulier, Monsieur SALHI Mounir.

Liste des abreviations

BSA : Sérum Albumine Bovin

Ea : Énergie d'activation

LysoPL : Lyso-phospholipase

PLA1 : Phospholipase A1

PLA2 : Phospholipase A2

PLB : Phospholipase B

PLC : Phospholipase C

PLD : Phospholipase D

PVA : Alcool Polyvinylique

T : Température

TAG : Tri Acyl Glycérol

U : Unité

UI : Unité Internationale

UIBMB : Union International de Biochimie
et de biologie Moléculaire

V₀ : vitesse initiale

K_m : Constante de Michaelis.

V_{max} : Vitesse maximale

Rpm : Rotation/minute

BET : Brunauer Emmett et Teller

CEC : Capacité d'échange cationique

DRX : Diffraction des Rayons X

IRTF : Infrarouge à Transformée de Fourier

UV : Ultra-violet

mmole/min : milimole/minute

Sommaire

| | |
|----------------------------|-----|
| Liste des figures | iii |
| Liste des tableaux | v |
| Introduction générale..... | 1 |

Chapitre I : Etude bibliographique

| | |
|---|----|
| I.1. Classes d'enzymes et signification technique | 4 |
| I.1.1. Les phospholipases..... | 5 |
| I.2. Le concept de l'activité enzymatique | 6 |
| I.3.1. Le pH..... | 7 |
| I.3.2. La température..... | 8 |
| I.4. Cinétique enzymatique..... | 9 |
| I.5. Immobilisation des enzymes | 11 |
| I.5.1. Support d'immobilisation | 11 |
| I.5.2. Les bentonites | 12 |
| I.5.2.1. Origine de la bentonite | 12 |
| I.5.2.2. Structure et composition de la bentonite | 13 |
| I.5.2.3. Propriétés physiques et chimiques | 14 |
| I.5.2.4. Utilisation de la bentonite comme support d'immobilisation des enzymes | 15 |
| I.5.3. Techniques d'immobilisation | 15 |
| I.5.4. Principe d'immobilisation par adsorption..... | 16 |
| I.5.6. Effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique | 17 |
| I.5.6.1. Le microenvironnement | 17 |
| I.5.6.2. La Stabilité..... | 17 |
| I.5.6.3. Inactivation | 18 |
| I.6. Application des phospholipases dans le dégommeage des huiles alimentaire | 19 |

Chapitre II: Matériels et méthodes

| | |
|---|----|
| II.1. Matériels | 22 |
| II.1.1. Enzyme | 22 |
| II.1.2. Support pour l'immobilisation | 22 |
| II.1.3. Autres produits et réactifs chimiques utilisés | 22 |
| II.2. Méthodes | 23 |
| II.2.1. Préparation du tampon | 23 |
| II.2.2. Méthode expérimentale utilisée pour l'immobilisation de la PLA1 | 23 |
| II.2.3. Méthodes analytiques..... | 23 |

| | |
|--|----|
| II.2.3.1. Méthodes de caractérisation physico-chimique de la bentonite | 23 |
| II.2.3.2. Dosage des protéines | 25 |
| II.2.3.3 Dosage de phosphore..... | 25 |
| II.2.4. Détermination de l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme..... | 25 |
| II.2.4.1. Activité lipasique..... | 25 |
| II.2.4.2. Activité phospholipasique | 26 |
| II.2.4.3. Optimisation du pH et de la température | 26 |
| II.2.4.4. la stabilité thermique | 26 |
| II.2.5. Détermination des paramètres cinétiques | 26 |
| II.3. Essai de dégommage enzymatique de l'huile de soja | 26 |

Chapitre III. Résultats et discussions

| | |
|---|----|
| III.1. Caractérisation physico-chimique de la bentonite | 28 |
| III.1.1. Analyse par spectroscopie IRTF..... | 28 |
| III.1.2 Analyse par diffraction des rayons X (DRX) | 29 |
| III.2. Analyse du spectre IRTF de la PLA1 immobilisée sur la bentonite | 30 |
| III.3. Etudes de l'activité enzymatique de PLA1 libre et immobilisée | 31 |
| III.3.1. Effet du pH sur l'activité phospholipasique | 32 |
| III.3.2. Effet de la température sur l'activité phospholipasique | 33 |
| III.3.2.1. Énergie d'activation..... | 34 |
| III.3.3.3. Stabilité thermique | 35 |
| III.3.3. Effet du pH sur l'activité lipasique de la PLA1 | 36 |
| III.3.4. Effet de la température sur l'activité lipasique de la PLA1 | 37 |
| III.4. Comparaison entre l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1 | 38 |
| III.4.1. Activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme libre..... | 38 |
| III.4.2. Activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme immobilisée | 39 |
| III.5. Détermination des paramètres cinétiques..... | 41 |
| III.6. Essai de dégommage de l'huile de soja par PLA1 libre et immobilisée sur la bentonite | 42 |
| Conclusion..... | 44 |
| Bibliographies | I |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure I. 1- Mécanisme de la catalyse. E_a et E_a' sont les énergies d'activation de la réaction non catalysée et catalysée. ΔG est la variation de l'énergie libre de la réaction | 2 |
| Figure I. 2 - Formation de la liaison peptidique | 3 |
| Figure I. 3 - Les différents niveaux de structuration des protéines | 3 |
| Figure I. 4- Mode d'action des phospholipases sur les phospholipides..... | 5 |
| Figure I. 5- Profil de la réaction d'hydrolyse du maltose avec la gluco-amylase versus le pH..... | 8 |
| Figure I. 6- Effet de la température sur la catalyse enzymatique. a) Activation par la chaleur ; b) dénaturation thermique | 9 |
| Figure I. 7- Relation entre la vitesse initiale et la concentration initiale du substrat | 9 |
| Figure I. 8- Facteurs influençant l'activité et la stabilité d'une enzyme | 10 |
| Figure I. 9- Constituants élémentaires du feuillet d'argile..... | 13 |
| Figure I. 10- Structure d'une montmorillonite et les positions possibles d'adsorption d'enzyme.. | 14 |
| Figure I. 11- Les différentes techniques d'immobilisations des enzymes | 16 |
| Figure I. 12- modification de la conformation et de l'accessibilité du site catalytique de l'enzyme du a son immobilisation | 18 |
| Figure I. 13- Les principales étapes de raffinage des huiles alimentaires..... | 19 |
| Figure I. 14- Structure des phospholipides et les réactions catalysées par les phospholipases..... | 20 |
| Figure I. 15- Organigramme du processus de dégommeage des huiles..... | 21 |
| Figure III. 1- Spectre IRTF de la bentonite. | 28 |
| Figure III. 2- Spectres DRX de la bentonite..... | 29 |
| Figure III. 3- spectres IRTF de : (a) PLA1-bentonite,(b) bentonite,(c) PLA1 | 30 |
| Figure III. 4- Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée en fonction du pH | 32 |
| Figure III. 5- Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée en fonction de la température (pH 7) | 33 |
| Figure III. 6- Représentation d'Arrhenius de l'énergie d'activation de la PLA1 immobilisée (a) et libre (b)..... | 34 |
| Figure III. 7- Stabilité thermique de PLA1 libre et immobilisée sur la bentonite | 35 |
| Figure III. 8- Evolution de l'activité lipasique de la PLA1 immobilisée et libre en fonction du pH (à T 40 °C)..... | 36 |
| Figure III. 9- Evolution de l'activité lipasique de la PLA1 immobilisée et libre en fonction de la température (pH 7) | 37 |

| | |
|--|----|
| Figure III. 10- Evolution de l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1 libre en fonction du pH..... | 38 |
| Figure III. 11- Evolution de l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1 libre en fonction de la température..... | 39 |
| Figure III. 12- Evolution de l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1 immobilisée en fonction du pH. | 40 |
| Figure III. 13- Evolution de l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1 immobilisée en fonction de la température..... | 40 |
| Figure III. 14- Représentation graphique de la cinétique de Michaelis-Menten. | 41 |
| Figure III. 15- Représentation de Lineweaver-Burk pour la PLA1 libre et immobilisée..... | 41 |
| Figure III. 16- variation du taux de phosphore dans l'huile traitée par l'enzyme libre et immobilisée..... | 43 |

Liste des tableaux

Tableau I. 1 - Avantages et inconvénients des enzymes comme catalyseurs4

Tableau I. 2 - Classification des supports12

Tableau II. 1– Propriétés de la Lecitase[®]Ultra (Novozymes A/S, 2007)22

Tableau II. 2- Composition chimique de bentonite (Taïko[®] 1G classique).....22

Introduction générale

Introduction générale

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 l'adapter aux conditions opératoires des procédés et de garantir son 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. 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, et d'autres, se concentraient sur l'aspect économique de leurs utilisations et travaillaient sur l'immobilisation et qui considéraient comme la meilleure démarche qui permet, non seulement l'amélioration de la stabilité d'enzyme, mais aussi réduire le coût de sa production et de son utilisation.

Le coût de production et d'utilisation des enzymes reste un inconvénient majeur quant à leurs applications à grande échelle. Pour pallier à ce problème, l'immobilisation des biocatalyseurs demeure une voie envisageable, et des enzymes immobilisés ont été utilisés avec succès dans plusieurs procédés industriels. Cependant, la réussite d'une telle procédure dépend fortement de la méthode d'immobilisation et du support utilisé [1].

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 prouvé leur efficacité dans leur utilisation comme support d'immobilisation des enzymes [2,3].

Une de ces enzymes concernées par la présente étude est la phospholipase A1, du nom commercial Lecitase®Ultra et récemment développée par Novozymes [4] en utilisant la technique impliquant le génie génétique. 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 à l'état libre et immobilisée sur la bentonite, et son application dans le dégomme des huiles végétales.

Le présent travail est divisé en trois chapitres, comprenant l'état de l'art et 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.

Chapitre I
Etudes bibliographique

Introduction

Beaucoup de réactions chimiques peuvent se produire spontanément ; d'autres exigent d'être catalysées pour obtenir un taux significatif. Les catalyseurs sont des molécules qui réduisent l'importance de la barrière d'énergie exigée pour qu'une substance soit convertie chimiquement en d'autres. Thermodynamiquement, l'importance de cette barrière d'énergie peut être commodément exprimée en termes de modification de l'Énergie libre. Comme représenté dans la Figure I. 1, les catalyseurs réduisent l'importance de cette barrière d'énergie en vertu de son interaction avec le substrat pour former un composé de transition activé qui livre le produit et libère le catalyseur. Le catalyseur n'est pas consommé ou modifié pendant la réaction. Ainsi, en principe, il peut être employé indéfiniment pour convertir le substrat en produit. Cependant, ceci est limité par la stabilité du catalyseur, c.-à-d., sa capacité de maintenir sa structure active avec le temps dans les conditions de la réaction [5].

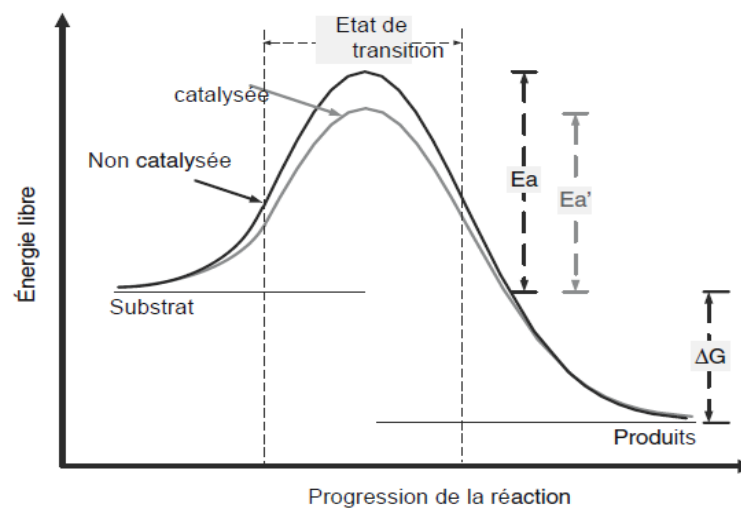


Figure I. 1- Mécanisme de la catalyse. E_a et E_a' sont les énergies d'activation de la réaction non catalysée et catalysée. ΔG est la variation de l'énergie libre de la réaction [5].

Les réactions biochimiques, en revanche, exigent d'être catalysées par des catalyseurs particuliers. De tels catalyseurs sont des enzymes.

Les enzymes sont des protéines fonctionnelles de masse moléculaire élevée (de 10 à 1000 kDa) [6] et constituées de plusieurs acides α aminés de la série L unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide (Figure I. 2).

Les enzymes sont naturellement adaptées pour agir dans des conditions physiologiques. Cependant, l'utilisation des enzymes en tant que catalyseurs dans des conditions artificielles, reste un défi majeur pour l'application de ces biocatalyseurs dans les procédés industriels. Ces biocatalyseurs (enzymes) agissent comme n'importe quel catalyseur, en réduisant la barrière d'énergie des réactions biochimiques, sans être modifiés. Cependant, les enzymes manifestent des propriétés tout à fait distinctes en comparaison avec les catalyseurs chimiques ; la plupart de ces propriétés sont une conséquence de leur structure moléculaire complexe [9,10]. Les avantages et les inconvénients des enzymes comme catalyseurs sont récapitulés dans le **Tableau I. 1**.

Tableau I. 1 - Avantages et inconvénients des enzymes comme catalyseurs

| Avantages | Inconvénient |
|--|-------------------------------|
| Spécificité élevée | Complexité moléculaire élevée |
| Activité élevée dans des conditions modérées | Coûts de production élevés |
| Nombre élevé de réutilisations | Fragilité intrinsèque |
| Hautement biodégradable | |
| Généralement considéré comme produits naturels | |

I.1. Classes d'enzymes et signification technique

Les enzymes sont classifiées selon les directives du comité de nomenclature de l'Union International de Biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB) dans six familles, basées sur le type de la réaction chimique catalysé [5,11].

- ✓ Les oxydoréductases : enzymes catalysant des réactions d'oxydoréduction.
- ✓ Les transférases : interviennent dans les réactions de transfert d'un groupement fonctionnel sur un récepteur ;
- ✓ les hydrolases : enzymes catalysant des réactions de l'hydrolyse,
- ✓ les lyases : catalysent la fixation ou le départ d'un groupement chimique avec création d'une double liaison sur le substrat ;
- ✓ les isomérases : interviennent dans les réactions d'isomérisation ;
- ✓ les ligases : permettent la formation des liaisons covalente entre de deux molécules.

Parmi ces six familles, seulement les hydrolases et les oxydoréductases ont eu une signification technique. La raison étant que ces enzymes sont bien dotées pour être utilisées comme biocatalyseurs, puisqu'elles sont des protéines robustes. Elles n'exigent pas des coenzymes et sont pour un nombre d'entre eux extracellulaires [5].

I.1.1. Les phospholipases

Correspondant à leurs importances dans le métabolisme des phospholipides, les phospholipases forment une grande classe d'enzymes avec une large diversité, elles sont répandues chez les procaryotes et les eucaryotes [12]. Les groupes de classification les plus simples sont les acyles hydrolases et les phosphodiesterases. 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 (voir **Figure I. 4**) On prend en considération 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 phosphodiesterases sont représentées par la phospholipase C (PLC) et la phospholipase D (PLD). En outre, chaque famille a beaucoup de sous-groupes ou d'isoenzymes, appartenant aux mêmes groupes. Ainsi, des centaines de phospholipases ont été purifiées, caractérisées, ou clonées de différents organismes [13,14].

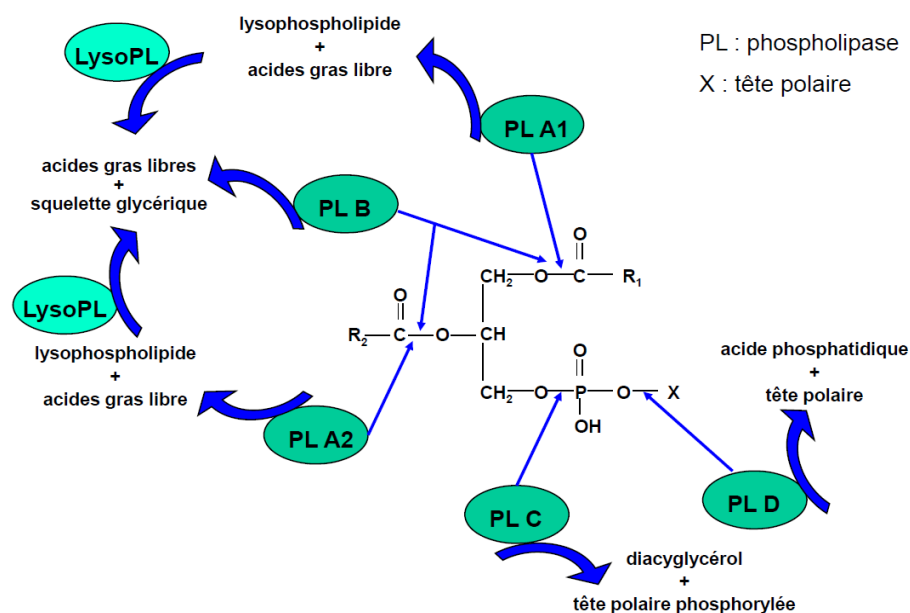


Figure I. 4- Mode d'action des phospholipases sur les phospholipides

La phospholipase A1

La phospholipase A1 (PLA1) (EC 3.1.1.32) 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 [14].

Des phospholipases A1 d'origine animale (porcine et bovine) et microbienne *Escherichia coli* et *Bacillus megaterium* avec une bonne activité catalytique ont été purifiées. Cependant, la quantité d'enzyme est limitée parce que la plupart des PLA1 microbiennes sont membranaires et les sources animales disponibles sont très limitées. Pour cette raison, une autre démarche a été entreprise, qui consiste à cloner et à exprimer le gène de la PLA1 dans d'autres micro-organismes, tel-est le cas de la Lecitase Ultra. En effet cette enzyme est produite par fermentation submergée d'une culture d'*Aspergillus oryzae* génétiquement modifiée, c'est-à-dire, elle contient le gène de la phospholipase A1 dérivée d'un autre microorganisme ; *Fusarium venenatum*. Il est important de noter que cette enzyme est beaucoup plus utilisée dans le procédé de dégomme des huiles végétales [15,16,17,18].

I.2.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 comme les contraintes de transfert de masse doivent être considérés. L'autre facteur à prendre en considération est 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 [19].

L'activité enzymatique est exprimée en Unité. L'IUBMB recommande de l'exprimer en unité internationales (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. En 1972, afin de souscrire aux systèmes internationaux des unités (SIU), l'activité doit être exprimée en mol par seconde et le katal a été proposé comme une nouvelle unité de l'activité enzymatique. Cette dernière définition, bien que recommandée, elle a quelques inconvénients pratiques et l'ancienne unité est toujours la plus employée [8,19].

L'activité enzymatique dépend strictement de sa structure moléculaire et compte sur l'existence d'une structure appropriée de son site actif [20]. Par conséquent, n'importe quel agent qui conduit aux déploiements de la protéine séparera les résidus constituant le site actif et réduira par conséquent son activité. Les conditions défavorables de température, du pH, de solvant, de présence de métaux lourds et des agents chélateurs peuvent provoquer cette 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 [8].

La stabilité n'est pas liée à l'activité et dans plusieurs cas elle a une tendance opposée [21]. 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 [5,22] .

I.3.1. Le pH

Le facteur principal déterminant la structure et la fonction d'une enzyme est le pH. En effet, le pH peut varier la distribution des charges dans le site actif et dans la molécule de protéine toute entière. D'autre part, le pH de la couche d'eau entourant une molécule enzymatique influence l'état d'ionisation des résidus avec les groupes acides et basiques des chaînes latérales [23]. Lorsque l'état d'ionisation d'un résidu qui est critique au mécanisme catalytique des enzymes est perturbé, comme, par exemple, un résidu de site actif qui participe au grippement du substrat, l'enzyme sera inactivée. En ce qui concerne l'activité enzymatique, il est bien connu que les réactions catalysées par une enzyme tendent à diminuer aux extrémités du pH montrant habituellement des maximum aux valeurs intermédiaires comme le montre la Figure I. 5 pour le cas d'hydrolyse du maltose avec la gluco-amylase [5].

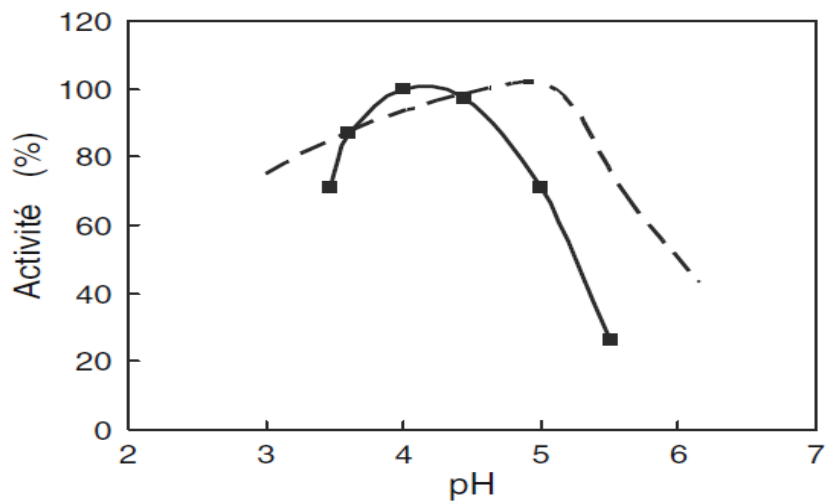


Figure I. 5- Profil de la réaction d'hydrolyse du maltose avec la gluco-amylase versus le pH. [5]

I.3.2. La température

Comme pour le pH, il existe une zone de température pour laquelle l'activité enzymatique est maximale. Cette variation de l'activité enzymatique en fonction de la température est déterminée par la mesure de la variation de la vitesse de la réaction en fonction de la température du milieu (figure I.6). En fait, la variation de l'activité enzymatique résulte de deux effets antagonistes :

- D'une part, l'activité des réactions chimiques par la chaleur qui se traduit par l'augmentation de l'agitation des molécules avec l'élévation de la température qui va accroître la fréquence de collisions entre le substrat et l'enzyme (courbe a) ;
- d'autre part, la dénaturation de la protéine enzymatique par la chaleur et leurs inactivations. Cette dénaturation va modifier les structures tertiaire et quaternaire de la protéine globulaire et donc faire passer l'enzyme d'une conformation active à une conformation dépourvue d'activité (courbe b) [21,5].

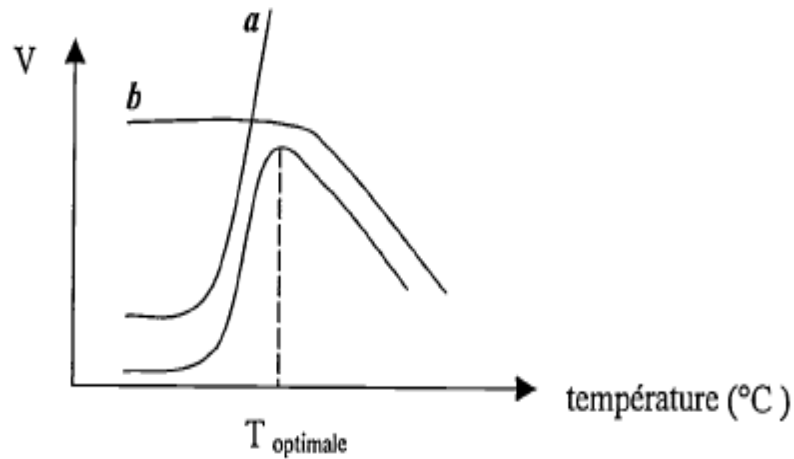


Figure I. 6- Effet de la température sur la catalyse enzymatique. a) Activation par la chaleur ; b) dénaturation thermique [5]

I.4. Cinétique enzymatique

Les valeurs de la constante de Michaelis K_M et de la vitesse maximale V_m d'une enzyme peuvent d'emblée, fournir certains renseignements sur son activité, bien qu'il fallait avant tout tenir compte de la concentration de l'enzyme pour savoir quelle sera l'efficacité de son action [24].

La constante de Michaelis permet de savoir quel est le degré d'adaptation de l'activité de l'enzyme à la concentration habituelle de son substrat. Quand elle est élevée, cela signifie que la fixation du substrat sur l'enzyme 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 substrat [25].

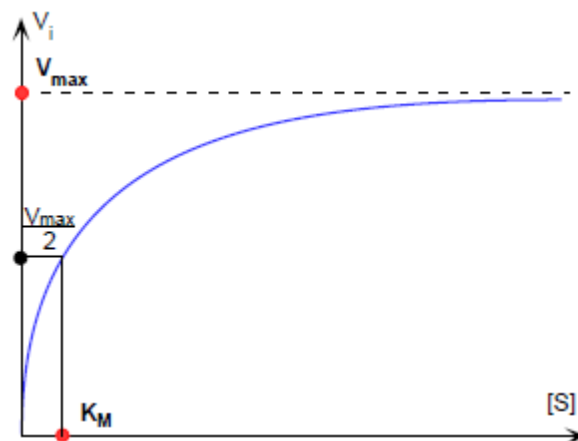


Figure I. 7- Relation entre la vitesse initiale et la concentration initiale du substrat.

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 I. 7. 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} [25].

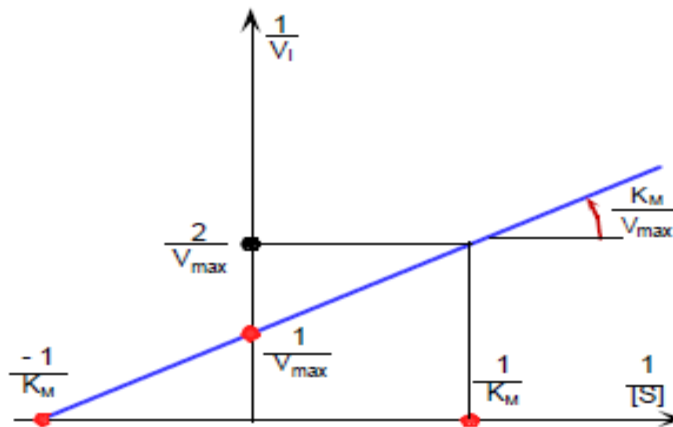


Figure I. 8- Facteurs influençant l'activité et la stabilité d'une enzyme

L'enzyme est alors saturé par le substrat, et chaque molécule d'enzyme catalyse la réaction au niveau le plus élevé possible dans les conditions de l'expérience. 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], $V = f ([S]) = a. [S] / (b + [S])$ 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, Km*.

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

$$V_0 = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S} \tag{I.1}$$

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 une linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten. En prenant l'inverse de la vitesse on obtient :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \tag{I.2}$$

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 $\frac{K_m}{V_{max}}$ (figure I.9). Cette méthode sera utilisée dans le Chapitre III pour le calcul de V_{max} et K_m de la PLA1 libre et immobilisée [5,26].

I.5. Immobilisation des enzymes

Le terme "enzymes immobilisées" se rapporte à des "enzymes physiquement confinées ou localisées dans une certaine région définie de l'espace avec la conservation de leurs activités catalytiques, et qui peut être employé à plusieurs reprises et sans interruption [27]. Les avantages des systèmes d'enzymes immobilisés comparés aux systèmes libres incluent la réutilisabilité, l'arrêt rapide des réactions, la résistance à l'environnement réactionnelle hostile, le coût abaissé, la formation contrôlée de produit, et la facilité de la séparation de l'enzyme des réactifs et des produits [28].

I.5.1. Support d'immobilisation

De diverses méthodes ont été développées pour l'immobilisation des enzymes, qui sont utilisés intensivement aujourd'hui. Une gamme de support a été également utilisée pour l'immobilisation d'enzymes. Les types de support peuvent être classifiés selon leur composition chimique, telle que les supports organiques ou inorganiques (**Tableau I. 2**) [1,29]

Tableau I. 3- Classification des supports**Organique****Polymères naturels**

- Polysaccharides : cellulose, dextrane, agar, agarose, chitine, alginate
- Protéines : collagène, albumine
- Carbone

Polymères synthétiques

- Polystyrène
- D'autres polymères : polyméthacrylates, polyacrylamide, polyamides, vinyle, et allylique-allyl-polymers de polyacrylate

Minéral

Minerais naturels : bentonite, silice

Matériaux traités : verre (pore non poreux et contrôlé), métaux, oxydes métalliques contrôlés de pore

I.5.2. Les bentonites**I.5.2.1. Origine de la bentonite**

Le terme bentonite a été proposé en 1898 pour désigner une argile au toucher savonneux appartenant à la formation "Benton shale" et affleurant dans la région de Rock River (Wyoming, Etats Unies) où la première exploitation de bentonite aurait été découverte en 1890. Cette formation tire son nom de Fort-Benton situé à 650 km environ au Nord de Rock River [30].

La bentonite est une argile issue de l'altération et la transformation hydrothermale des tufs volcaniques, elle fait partie principalement du groupe des smectites. Elle contient plus de 75% de montmorillonite, une argile dont son nom dérive d'un dépôt chez Montmorillon, en France méridionale [31]

En plus de la montmorillonite, la bentonite peut également contenir le feldspath, la biotite, la kaolinite, l'illite, la cristobalite, le pyroxène, le zircon, et le quartz cristallin [32].

I.5.2.2. Structure et composition de la bentonite

La structure cristalline des smectites est constituée d'une couche octaédrique d'alumine entre deux couches tétraédriques de silice figure I.9 et I.10. 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.

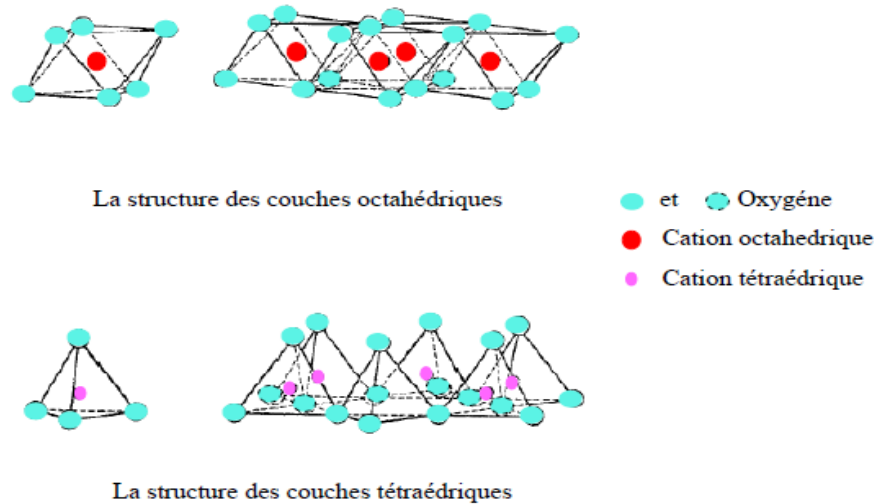


Figure I. 9- Constituants élémentaires du feuillet d'argile.

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.

Pour la bentonite, dans la coordination octaédrique, 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 [33]. Le déficit de charge est compensé par des cations mobiles appelés cations compensateurs qui viennent se loger dans l'espace interfoliaire en s'entourant de plusieurs molécules d'eau. La nature des cations échangeables affecte la quantité de prise d'eau de gonflement. La perte d'eau de rétention entre les feuilles 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. Le chauffage à 800-900 °C désintègre le réseau cristallin et produit une série de phases, comme la mullite, la cristobalite, et la cordiérite, selon la composition et la structure initiales. [34]

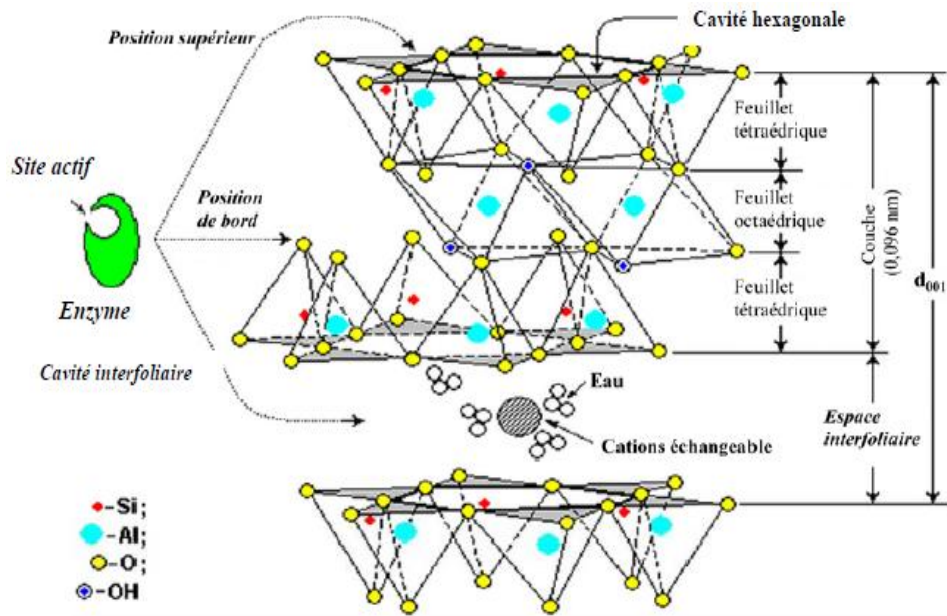


Figure I. 10- Structure d'une montmorillonite et les positions possibles d'adsorption d'enzyme.

I.5.2.3. Propriétés physiques et chimiques

La bentonite fraîchement exposée est blanche vert pâle ou bleu, avec l'exposition à l'obscurité elle a tendance à devenir jaune, rouge, ou marron. Les propriétés particulières de la bentonite sont :

- Une capacité de former des gels thixotrophique avec de l'eau,
- Une capacité d'absorber de grandes quantités d'eau avec une augmentation de volume de pas moins de 12 à 15 fois son volume sec,
- Et une capacité élevée d'échange cationique.

Comme décrites précédemment, les substitutions de l'aluminium par des cations de charge inférieurs provoquent un excès des charges négatives dans le réseau qui est équilibré par les cations (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) qui viennent se loger dans l'espace intercalaire ou interfoliaire. Cette capacité d'échange cationique permet à l'argile de lier par échange ionique des cations extérieurs inorganiques ou organiques tels que les particules biologiques comme les rheovirus et les protéines [3].

L'ensemble des cations mobiles forme la capacité d'échange cationique ou CEC et la surface de l'espace interfoliaire additionnée à celle de bordure des feuillets forment la surface spécifique. Ces deux paramètres (CEC et surface spécifique) permettent à la bentonite d'être un matériau à grand pouvoir d'adsorption [35].

I.5.2.4. Utilisation de la bentonite comme support d'immobilisation des enzymes

La bentonite est employée dans plusieurs domaines par exemple dans la purification, la décoloration des huiles minérales et alimentaires, les colorants, les produits cosmétiques et pharmaceutiques, dans l'élimination des virus, des pesticides, des herbicides et d'autres toxines et ceci est dû à leur surface spécifique élevée et à leurs propriétés d'adsorption [3,31]. L'adsorption des composés organiques sur les argiles dépend du type du composé et des propriétés intrinsèques de la solution. En plus de ces derniers, si on prend le cas de la montmorillonite, elle est acide de nature et les sites acides peuvent servir comme des moyens de fixation des protéines par les groupements NH_2 [36].

Selon Öztürk et al. (2008) [36], la plupart des études menées sur l'immobilisation des enzymes sont orientées beaucoup plus sur les variations de l'activité et sur les propriétés et la morphologie de minerai d'argile après l'immobilisation. Les études menées sur l'activité de l'enzyme ont été réalisées sur des réacteurs en batch, et sur des réacteurs à lit fluidisé ou rempli. De l'argile pure, des composés argileux-organiques ou des minerais d'argile intercalés par des ions métalliques et des argiles synthétiques ont été utilisés pour immobiliser les enzymes [37,38]. De récentes études évoquent l'utilisation de la bentonite comme support d'immobilisation des enzymes, entre autres l'immobilisation des lipases [37,39,40], de la Pectinilyase [41], de la phosphatase [2] des α -l'amylose [38], de la catalase [36].

I.5.3. Techniques d'immobilisation

Les enzymes peuvent être immobilisées soit par rétention physique, soit par liaison chimique, (figure I.11) 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 simple interaction ionique (adsorption), soit par la création d'une vraie liaison covalente [19,42].

I.5.6.Effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique

Afin de décider pour quelle technique d'immobilisation à employée il est d'abord important de comprendre les changements des propriétés physiques et chimiques qu'une enzyme peut subir lors de l'immobilisation. Les changements de stabilité et les propriétés cinétiques des enzymes immobilisées est du en raison du microenvironnement imposé sur elles par le support et également par les produits de leurs l'action [1].

I.5.6.1. Le microenvironnement

Les Interactions ioniques et hydrophobes, ou autres entre l'enzyme et le support (effets microenvironnement) peuvent avoir comme conséquence des changements dans les valeurs de K_m et de V_{max} .

Ces effets sont normalement provoqués par des variations dans l'équilibre de dissociation des groupes chargés du site actif de l'enzyme. Une fois qu'une enzyme immobilisée, elle se trouve dans un microenvironnement qui peut être rigoureusement différent de celui à l'état libre. Le nouveau micro-environnement peut être un résultat de phénomène physique et chimique du support seulement, ou il peut résulter des interactions de support avec les substrats ou les produits impliqués dans la réaction enzymatique. [1,8].

I.5.6.2.La Stabilité

Les auteurs qui ont mené 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 [1,37].

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 immobilisé est plus rigide que l'enzyme libre. Cette rigidité les protège contre le déploiement et préserve leur structure catalytiquement active. Par conséquent, l'immobilisation permet à l'enzyme d'être active d'une façon optimale dans des conditions de dénaturation (par exemple, les températures plus élevées) [19].

I.5.6.3. 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 sorte que le substrat ne peut pas accéder au site actif qui est bloqué (figure I.12). Ainsi, la valeur de l'activité de l'enzyme immobilisée est habituellement moindre que celle de l'enzyme libre [1].

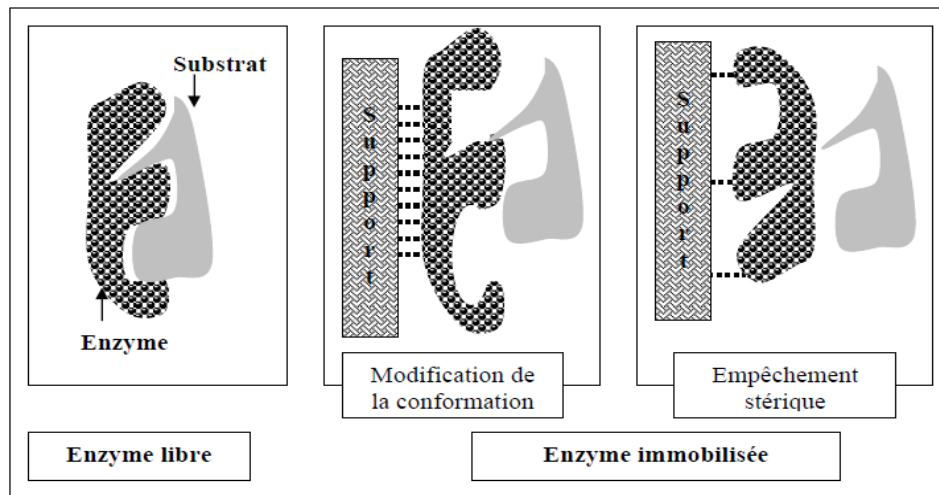


Figure I. 12- Modification de la conformation et de l'accessibilité du site catalytique de l'enzyme due à son immobilisation.

Des changements de conformation de l'enzyme provoquée par l'immobilisation diminuent généralement son affinité pour le substrat (augmentation de K_m). En outre, une inactivation partielle de tout ou partie de l'inactivation complète d'une molécule d'enzyme peut se produire (diminution de V_{max}) [29].

I.6. Application des phospholipases dans le dégommage des huiles alimentaire

Les huiles végétales brutes contiennent des quantités variables d'impuretés non triglycéridiques (acides gras libres, matières en suspension, cire, pigments, traces de pesticides et des traces de métaux, etc.), qui ont un effet néfaste sur sa qualité en termes de stabilité oxydative [45]. La plupart de ces impuretés, notamment les phospholipides, nuisent à la qualité de l'huile (gout, odeur, apparence, stabilité) du produit fini et doivent être enlevées par le raffinage. Dans le même temps, il est important de conserver dans l'huile raffinée les composés mineurs qui présentent un effet bénéfique pour l'huile (tocophérols, tocotriénols, stérols, etc.) [46].

Une classe importante de ces composés indésirables sont les phosphatides (généralement connus sous le nom de lécithine), dérivés des graines et présent sous forme hydratante et non hydratante. Le procédé de raffinage a pour objectif principal de retirer ces impuretés et met en œuvre une série d'étapes qui présentent chacune ses objectifs. Il existe deux types principaux de raffinage : le raffinage chimique et le raffinage physique (voir Figure I. 13) [4].

En raffinage chimique, les acides gras libres et la plupart des phospholipides et autres impuretés sont enlevés dans l'étape de neutralisation alcaline ; une étape séparée de dégommage n'est donc pas nécessaire. Cependant, le raffinage physique est de plus en plus employé, en raison des coûts et des avantages environnementaux. Dans le raffinage physique, l'eau est utilisée pour enlever la partie hydratante de gomme. Des acides phosphoriques sont ajoutés pour transformer les gommages restantes à une forme hydratante qui peut alors être enlevée par de l'eau et centrifugation [47].

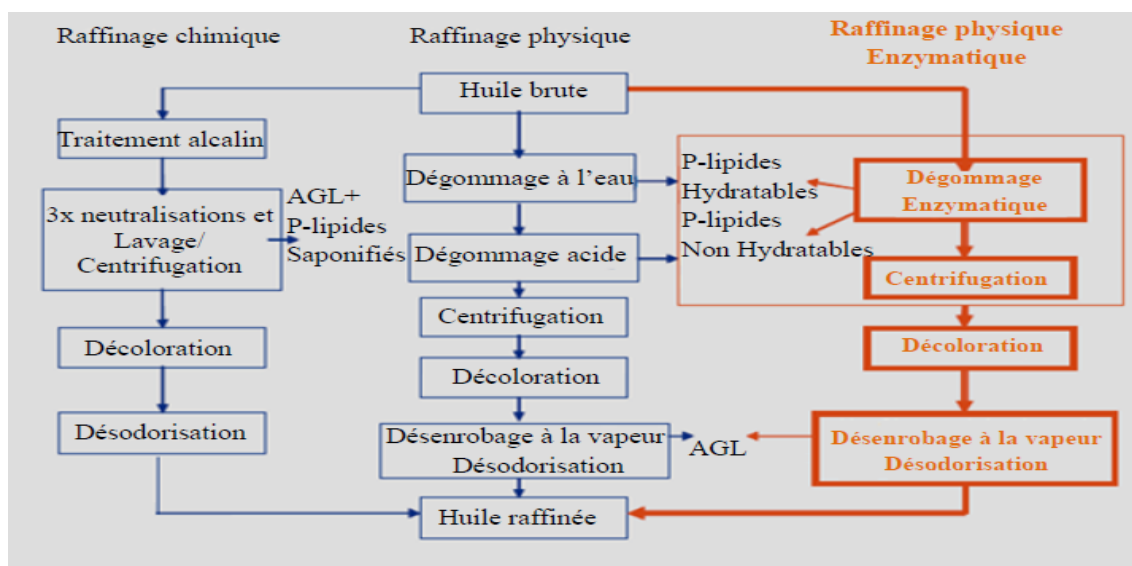


Figure I. 13- Les principales étapes de raffinage des huiles alimentaires.

Pour obtenir physiquement une huile raffinée de bonne qualité, il est essentiel d'avoir une teneur en phosphore presque réduite à 5 ppm avant le Désenrobage à la vapeur. Pour cette raison, le raffinage physique a été principalement employé pour des huiles à acidité élevée et contenant des teneurs faibles en phospholipides [45].

Le procédé traditionnel de dégomme, y compris le traitement à l'acide [47], dégomme à l'eau [48], superbe dégomme [49], dégomme total [50], et procédé d'ultrafiltration [51], etc., ne peuvent pas garantir une teneur de phosphore (<10 mg/kg) requise pour des applications industrielles. La perte de rendement et d'éléments nutritifs, l'appareillage et les besoins en énergie, le besoin en grandes quantités d'eau et de produits chimiques, une forte production des effluents sont également des Imperfections techniques et environnementaux de ces procédés [52].

Le dégomme enzymatique a été rapporté en 1990 par Roehm et Lurgi ou une phospholipase a été employée pour transformer les phospholipides non hydratés en formes hydratés (Figure I. 14), puis enlevé par centrifugation.

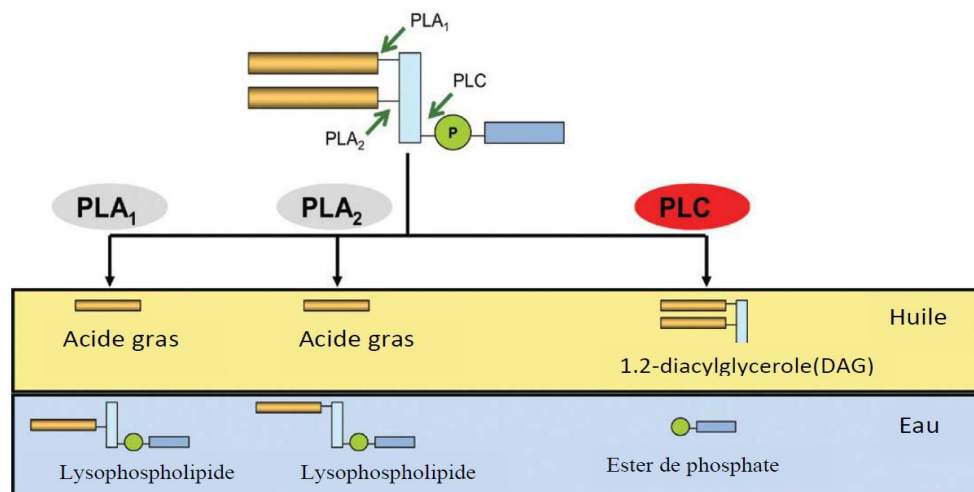


Figure I. 14- Structure des phospholipides et les réactions catalysées par les phospholipases.

Le processus d'EnzyMax peut être subdivisé en quatre étapes comme le montre la **Figure I. 15** :

- (i). l'ajustement des conditions optimales pour la réaction enzymatique, *c.-à-d.* un pH optimal avec une solution tampon d'acide citrique et la température optimale ;
- (ii). L'addition de la solution d'enzyme ;
- (iii). La réaction enzymatique ;
- (iv). La séparation du lysophosphatide de l'huile à 70 °C environ [15,47]

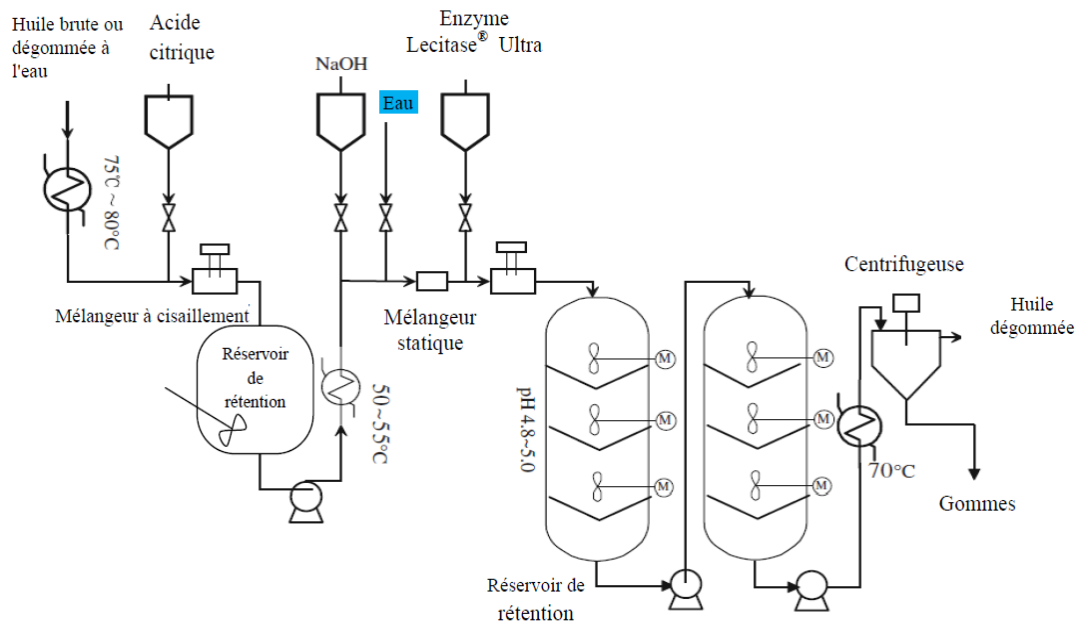


Figure I. 15- Organigramme du processus de dégommeage des huiles.

Comparativement aux procédés classiques, le dégommeage enzymatique a beaucoup d'avantages. Indépendamment de la réduction des quantités d'acide et de bases utilisées, on a une réduction en effluents, produits pendant le procédé de raffinage, un perfectionnement dans les rendements de produit et une réduction des frais d'exploitation [53]. Le dégommeage enzymatique offre un chemin biologique sans risque et une solution respectueuse de l'environnement.

Chapitre II

Matériels et méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. 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 (Bagsvaerd, Denmark). Cette enzyme nous a été donnée gracieusement par la compagnie Cevital SPA, Béjaïa. Les propriétés de la Lecitase[®]Ultra sont récapitulées dans le tableau II-1 ci-dessous.

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

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

II.1.2. Support pour l'immobilisation

Le support utilisé dans cette étude pour l'immobilisation de la PLA1 est la bentonite commercialisée par Taïko[®]Classic 1G(Malaysia), utilisée dans la décoloration des huiles végétales. Le support a été utilisé sans aucun traitement complémentaire au niveau du laboratoire.

Tableau II. 2-Composition chimique de bentonite (Taïko[®] 1G classique)

| 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 |

II.1.3. Autres produits et réactifs chimiques utilisés

Les solutions de substrats employées pour évaluer l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme (Lecitase Ultra) ont été préparées respectivement à partir de la lécithine et de l'huile d'olive. L'alcool polyvinylique (PVA) a été employé comme agent tensio-actif dans la préparation des solutions de substrats.

La dimension particulaire de ce support est entre 45 -165 μm et sa surface spécifique déterminée par la méthode de BET est de $167 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$.

Le tampon utilisé dans cette étude a été préparé avec l'acide citrique et di-Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4). Tous les autres produits chimiques utilisés étaient de qualité analytique et d'une grande pureté. En outre, toutes solutions ont été préparées avec de l'eau distillée.

II.2.Méthodes

II.2.1.Préparation du tampon

Les solutions tampons ont été préparées selon les méthodes décrites dans Lange's Handbook of Chemistry [54]. La solution tampon d'acide citrique (pH 4 -8) a été préparée à partir de l'acide citrique et Na_2HPO_4 suivant le protocole contenu dans la littérature [54].

II.2.2.Méthode expérimentale utilisée pour l'immobilisation de la PLA1

La PLA1 a été mélangée avec la solution tampon d'acide citrique selon un rapport volumique 1:5. L'immobilisation par adsorption sur la bentonite a été réalisée en ajoutant au support la solution enzymatique à un rapport volume/masse 5 : 0.5. La suspension a été maintenue sous agitation constante à 250 rpm à l'air libre pendant deux heures. Ensuite, la bentonite est séparée par filtration après lavage avec la solution tampon. Les eaux de lavages sont récupérées et soumises aux analyses des protéines.

II.2.3.Méthodes analytiques

II.2.3.1. Méthodes de caractérisation physico-chimique de la bentonite

Dans le cadre de notre étude, nous évoquons les techniques de caractérisation de solide (bentonite) : la diffraction des rayons X (D.R.X) et la Spectroscopie Infrarouge.

a) La spectroscopie infrarouge

La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier FTIR (Fourier Transformed Infra Red spectroscopy) 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 au domaine d'énergie de vibration 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 spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption.

Pour identifier les groupements fonctionnels de surface de la bentonite, on prépare des pastilles de KBr (1 %) que l'on introduit dans l'appareil pour l'analyse [55].

b) Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X est une méthode universellement utilisée pour identifier la nature et la structure des produits cristallisés. En effet, cette méthode ne s'applique qu'à des milieux cristallins (roches, cristaux, minéraux, pigments, argiles...) c'est-à-dire, des matériaux ayant un arrangement périodique ordonné. Les atomes sont donc organisés en plans réticulaires plus ou moins denses, désignés par leurs coordonnées (h, k, l) dans un système de repérage de l'espace. Ces plans réticulaires sont séparés par des distances caractéristiques (d) selon la nature du cristal ou du minéral considéré. Trois ou quatre distances réticulaires bien choisies permettent une reconstitution du réseau cristallin du matériau.

Avec un rayonnement de longueur d'onde suffisamment petite, on peut obtenir des diffractions par les plans réticulaires (de la même manière que les rayons lumineux sont diffractés par les petites fentes d'un réseau en optique). Cette réfraction est d'autant plus intense que le plan est dense, c'est-à-dire riche en atomes [56].

Un faisceau de rayons X incident de longueur d'onde λ , ne sera réfléchi par une famille de plan (h, k, l) que dans la mesure où il rencontre ces plans sous un certain angle θ dit angle de Bragg tel que :

$$\sin \theta = \frac{n \cdot \lambda}{2 \cdot d_{(h,k,l)}} \quad (\text{II.1})$$

Ou encore :

$$n \lambda = 2d_{(h,k,l)} \sin \theta \quad (\text{II.2})$$

II.2.3.2. 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 [57], utilisant la BSA comme étalons. Le dosage a été effectué par spectrophotométrie (UV mini-1240, SHIMADZU) à une longueur d'onde de 590 nm et la teneur en protéines a été déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage (Annexe 1).

II.2.3.3. Dosage de phosphore

La teneur en phosphore a été déterminée selon la méthode rapportée par Yang et al. [50] Et effectuée comme suite : 0.2 mg de MgO et 2 g de l'huile sont calciné à 800 °C pendant 2 heures jusqu'à obtention de cendre blanche. Le dosage du phosphore a été déterminé par spectrophotométrie (UV mini-1240, SHIMADZU) à une longueur d'onde de 650 nm selon la méthode AOCS Ca 5a-40 [58]. La courbe d'étalonnage (Annexe 2) a été utilisée pour déterminer la teneur en phosphore contenue dans l'huile brute et traitée par l'enzyme libre et immobilisée.

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

II.2.4.1. Activité lipasique

L'activité lipasique a été déterminée par la méthode titrimétrique comme décrite par Yang et al. (2006) [15]. L'alcool polyvinylique à 4 % et l'huile d'olive sont émulsionnés avec un rapport volumique 1 : 4. Ensuite 5 ml de l'émulsion de l'huile d'olive et 10 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 arrêtée par l'ajout d'un volume 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 μ mole d'acides gras libres titrables par minute dans les conditions décrites ci-dessus. Les résultats de notre travail sont exprimés en activité relative.

II.2.4.2. Activité phospholipasique

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

II.2.4.3. Optimisation du pH et de la température

Pour déterminer le pH optimal, l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme libre et immobilisée a été effectuée à différentes valeurs du pH de la solution tampon d'acide citrique (pH 4 — 8). La température optimale a été déterminée en variant la température de 30 à 80 °C.

II.2.4.4. la stabilité thermique

La stabilité thermique de PLA1 libre et immobilisée a été déterminée en incubant l'enzyme libre et immobilisée dans la solution tampon (pH 7) à des températures de 50, 55, 60, 65 et 70 °C pendant 1 heure. Après 1 heure, les enzymes ont été immédiatement refroidies à des températures ambiantes et les activités ont été mesurées. L'activité relative a été définie comme valeur proportionnelle à l'activité initiale (100 %).

II.2.5. 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 de 20-140mg/ml, dans les conditions optimales de pH, de températures et de concentration d'enzyme constante.

II.3. Essai de dégomme enzymatique de l'huile de soja

L'essai de dégomme de l'huile brute de soja a été réalisé en batch avec la PLA1 libre et immobilisée en utilisant les conditions optimales recommandées par Novozymes [4]. 200 ml de l'huile de soja et un faible volume d'acide citrique (36 %) ont été placés 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, et puis le pH a été ajusté à 5.5-6.0 avec une solution de soude (NaOH 1N). Un petit volume de l'eau a été ajouté à l'huile sous agitation. 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 (50 °C) sous agitation mécanique (250 rpm) pendant 8 heures. Les échantillons pour l'analyse de phosphore ont été prélevés à des intervalles d'une heure.

Chapitre III

Résultats et discussions

III.1. Caractérisation physico-chimique de la bentonite

Afin d'identifier ses propriétés physico-chimiques, la bentonite est caractérisée en utilisant quelques méthodes disponibles au niveau de l'université de Bejaia à savoir la Diffraction de Rayons X (DRX) et la spectrométrie Infra Rouge (IRTF).

III.1.1. Analyse par spectroscopie IRTF

Afin de mettre en évidence les groupements fonctionnels chimiques présents dans la bentonite, nous avons fait appel à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, les résultats obtenus sont représentés dans la figure III.1.

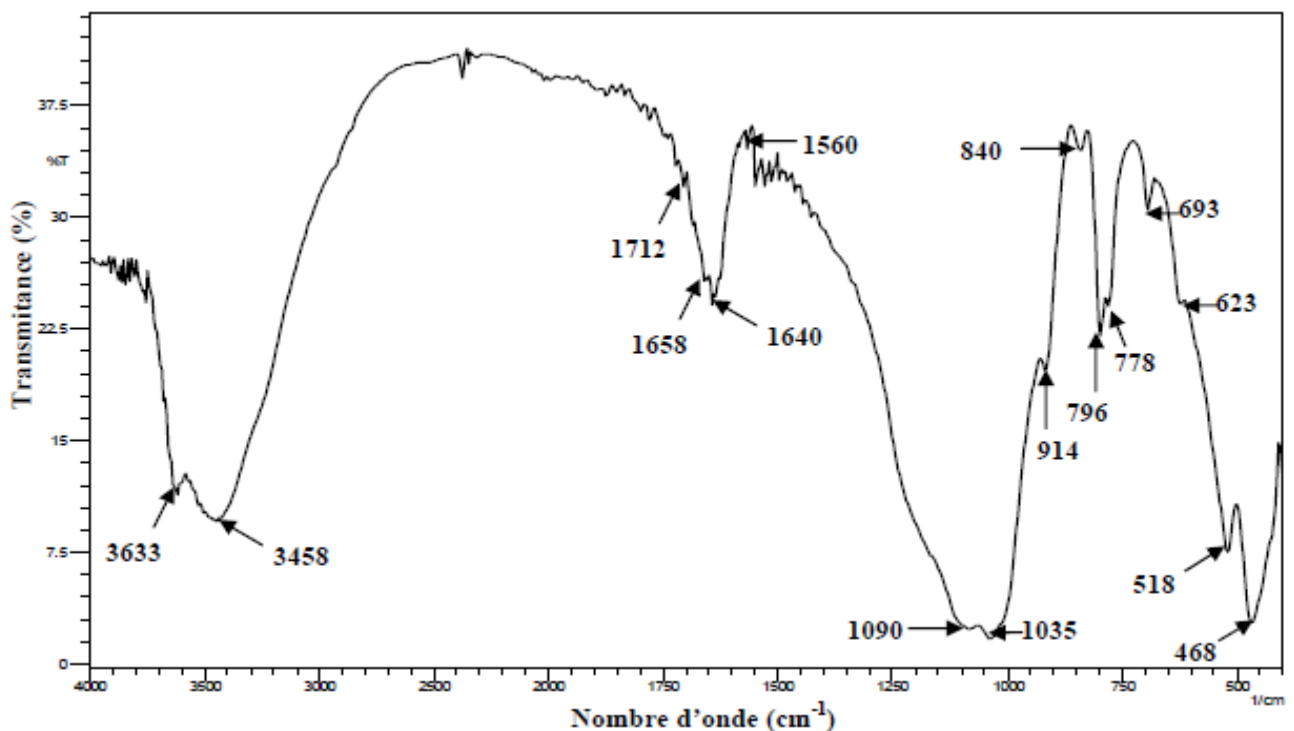


Figure III. 1- Spectre IRTF de la bentonite.

L'examen de spectre fait apparaître des bandes d'absorption que nous présentons comme suit :

➤ **Groupements OH :**

- La bande située dans l'intervalle 3200-3800 cm⁻¹, avec un pic intense et des épaulements à 3633 et 3458 cm⁻¹ caractérisent la montmorillonite [59].
- 3633 cm⁻¹ Al-Al-OH correspond aux vibrations d'élongation des groupements OH de la couche octaédrique. Coordonnée soit à 1 Al⁺¹ Mg soit à 2 Al [3,60]
- la bande 3458 cm⁻¹ caractérise les vibrations de déformation des molécules H₂O ;

- La bande centrée vers 1640cm^{-1} est attribuée aux vibrations de déformation des molécules de H_2O adsorbées entre les feuillets. [30]

➤ **Liaisons Si-O**

Les liaisons Si-O sont caractérisées par les bandes d'absorption suivantes :

- La bande vers 1040 cm^{-1} correspond aux vibrations de valence de la liaison Si-O ; [3]
- La bande vers 914cm^{-1} correspond aux vibrations de déformation de Al-Al-OH ; [3]
- La bande située à 840 cm^{-1} correspond aux vibrations de déformation de Al-Mg-OH ; [3]
- Les bandes de longueurs d'onde 796 et 778 cm^{-1} correspondent respectivement aux vibrations d'élongations de Si-O de quartz et silice et de vibration d'élongation de Si-O de quartz [32].
- La bande située à 622cm^{-1} correspond à des vibrations en dehors du plan de Al-O et Si-O ;
- Les bandes situées à 518 et 468 cm^{-1} sont attribuées respectivement aux vibrations de déformation des liaisons Si-O-Al et Si-O-Si [61,31].

III.1.2 Analyse par diffraction des rayons X (DRX)

L'analyse par diffraction des rayons X nous permet d'identifier les différentes phases minéralogiques qui constituent la bentonite étudiée. Les résultats obtenus sont représentés par les diffractogrammes illustrés par la figure III.2.

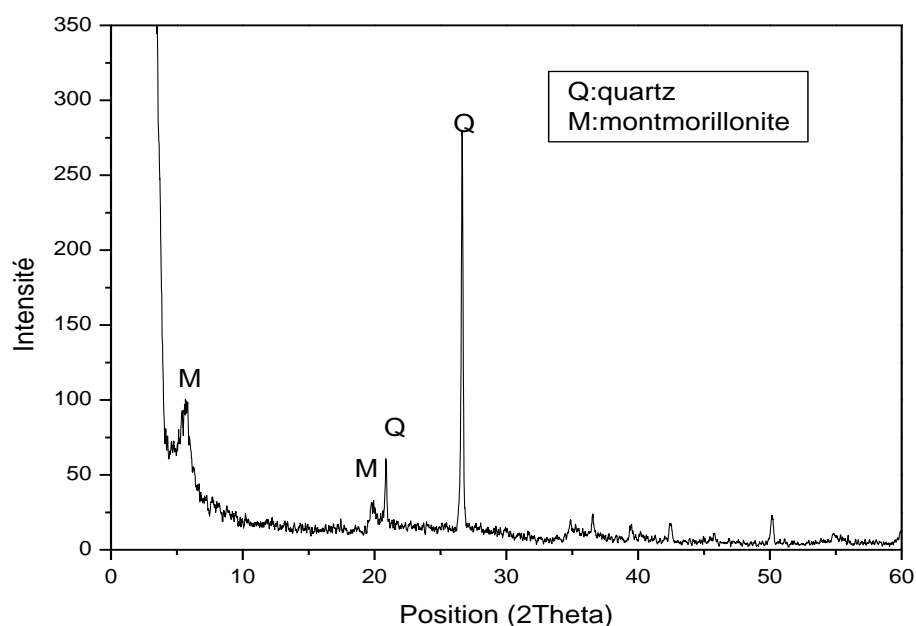


Figure III. 2- Spectres DRX de la bentonite.

Cette terre est principalement un mélange de montmorillonite (M) et de quartz (Q). Les pics caractéristiques de la montmorillonite et du quartz principalement observé sur le diffractogramme sont :

1. Les pics à 5° et 20° caractéristiques de la montmorillonite (M); [3]
2. Les pics situés à 21° et 27° révèlent la présence de quartz (Q) [32].

III.2. Analyse du spectre IRTF de la PLA1 immobilisée sur la bentonite

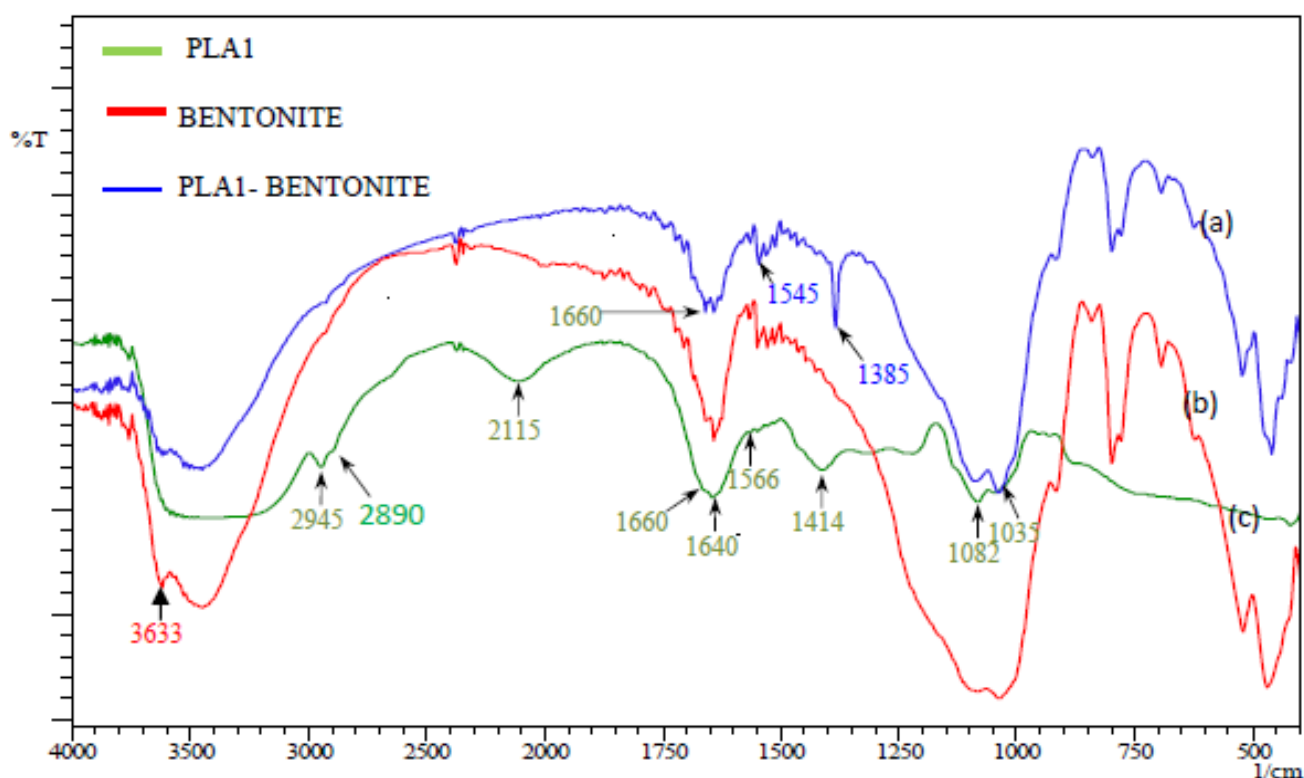


Figure III. 3- spectres IRTF de : (a) PLA1-bentonite, (b) bentonite, (c) PLA1

Pour mieux expliquer l'activation interfaciale de la PLA1 sur la bentonite, les changements conformationnels de la PLA1 lors de l'immobilisation sur la bentonite ont été étudiés par la spectroscopie de FTIR. Il est bien connu que la spectroscopie de FTIR soit considérée comme une technique puissante pour la détermination de la structure secondaire de la protéine. L'amide I dans la gamme de 1600-1700 cm^{-1} et d'origine de vibration d'allongement du C=O ; l'amide II à 1510-1580 cm^{-1} avec une intensité plus faible est en grande partie dû aux vibrations de déformation de N-H avec une contribution de vibration d'allongement de C-N, et cette bande est associée aux vibrations de chaîne latérale et aux changements des liaisons hydrogène de la protéine [62,63].

La figure III.3 montre les spectres de FTIR de la PLA1 libre, de la PLA1 immobilisée avec la bentonite et le spectre de la bentonite.

Les bandes de l'amide I et II dans le spectre de PLA1 libre vont nous confirmer si la PLA1 a été chargée sur les supports. Suivant les indications de la figure III.3(c), on a observé la bande de l'amide I de la PLA1 libre à 1650 cm^{-1} . Alors que, cette bande était probablement troublée par la bande des vibrations de déformation de OH de l'eau de la bentonite (environ 1640 cm^{-1}) (figure

III.3), ayant pour résultat une bande plus intense à 1640 cm^{-1} de l'amide I de la PLA1 immobilisées figure **III.3. (a)** par conséquent, les changements structuraux de la PLA1 immobilisée n'ont pas pu être déterminés selon la bande de l'amide I. On observe les différences spécifiques en amide II de PLA1 libre et de PLA1 immobilisée dans figure III.3.

L'amide II de la PLA1 libre a été observé à 1545 cm^{-1} , de même pour PLA1 immobilisée, mais avec une intensité plus significative (figure III.3 [a]). Cette augmentation de l'intensité de l'amide II pour la PLA1 immobilisée indique que les chaînes latérales de la PLA1 aient été correctement fixées sur les supports par des liaisons hydrogène et des forces de Van der Waals à l'interface hydrophobe entre la PLA1 et la bentonite [64].

La bande d'allongement d'AlOH dans le spectre de FTIR de la bentonite a diminué en raison de l'interaction avec les protéines de l'enzyme. en particulier, la bande de déformation et d'allongement d'AlOH située à 3633 cm^{-1} . Puisque le cation d' Al^{3+} au centre de la couche octaédrique de la bentonite a la caractéristique d'acide de Lewis, il est coordonné par le groupe d'amine de la protéine de l'enzyme, en outre, la bentonite est acide en nature ; les sites acides peuvent servir de centres de liaisons pour le groupe NH_2 de la protéine. En effet, tous ces changements dans le volume des pics peuvent être causés par l'interaction entre le cation d' Al^{3+} au centre de la couche octaédrique ou éventuellement de Si^{4+} au centre de la couche tétraédrique de bentonite et le groupe NH_2 de protéine de l'enzyme [36].

La bande située à 1383 cm^{-1} (figure III.3. (a)) correspond aux vibrations d'allongement de C-N situés dans la gamme de 1300 cm^{-1} à 1800 cm^{-1} .

III.3. Etudes de l'activité enzymatique de PLA1 libre et immobilisée

Afin de déterminer l'activité enzymatique de la PLA1 on a utilisé la lécithine de soja comme substrat pour déterminer l'activité phospholipasique et l'huile d'olive pour déterminer l'activité lipasique. La méthode utilisée est celle décrite par Yang et al. (2006) [15]. Les mesures de l'activité de la phospholipase ont été effectuées à différentes valeurs du pH et de température. Les résultats exprimés en activité relative sont donnés par la relation III.1.

$$\text{Activité relative} = \frac{\text{Activité enzymatique}}{\text{Activité enzymatique maximale}} \times 100 \quad (\text{III.1})$$

III.3.1. 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 [65,64]. L'effet du pH sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée ont été déterminés à une température de 40 °C, en variant le pH de la solution tampon d'acide citrique 0.05 N, de 4 à 8. Les résultats obtenus sont repris dans la figure III.4. Il ressort de celle-ci que la PLA1 libre et immobilisée exhibe une activité maximale à pH 7.

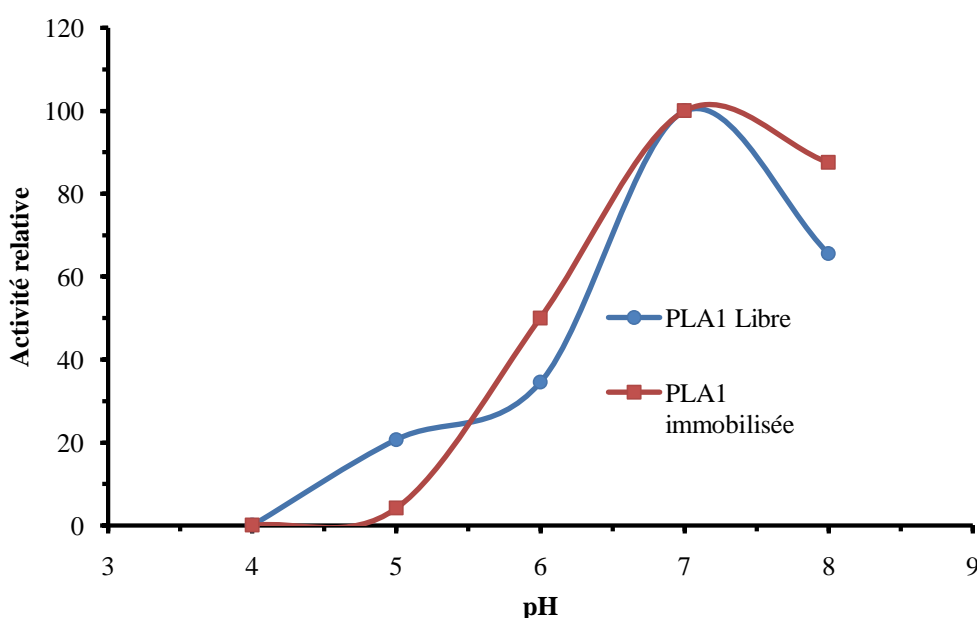


Figure III. 4- Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée en fonction du pH

Ceci indique que l'immobilisation n'a pas eu d'effet significatif sur le pH optimal de l'enzyme. On peut suggérer que ceci est dû aux faibles changements produits dans le microenvironnement de l'enzyme. En effet à pH 5, la PLA1 libre atteint 20 % de son activité relative maximale et 2 % lorsqu'elle est immobilisée. En termes d'activité spécifique, l'enzyme dans son état libre montre une activité de 1450 U/ml pour une concentration en protéine de 14 mg/ml, à pH 7. Dans les mêmes conditions, elle manifeste une activité de 1050 U/g de support pour une concentration en protéine de 10 mg/ml. Donc il est évident que l'enzyme exprime une activité spécifique plus élevée qu'à l'état libre.

III.3.2.Effet de la température sur l'activité phospholipasique

La figure III.5 montre l'effet de la température sur l'activité de la PLA1 libre et immobilisée sur la bentonite. À 40 °C, l'enzyme libre atteint son activité maximale, et seulement 80 % pour la PLA1 immobilisée. Ce n'est qu'à 55 °C qu'elle exprime son activité maximale.

La PLA1 immobilisée a conservée son activité à des températures élevées comparées à la PLA1 libre, qui a perdu plus de 70 % de son activité maximale à 55 °C ce qui indique un déplacement dans l'optimum de la température vers les plus grandes valeurs. Ceci peut avoir comme origine une amélioration de sa stabilité et qu'elle est moins mobile. La perte de l'activité à des températures élevée est due à la sensibilité de l'enzyme aux températures élevées vu qu'elle est de nature protéique.

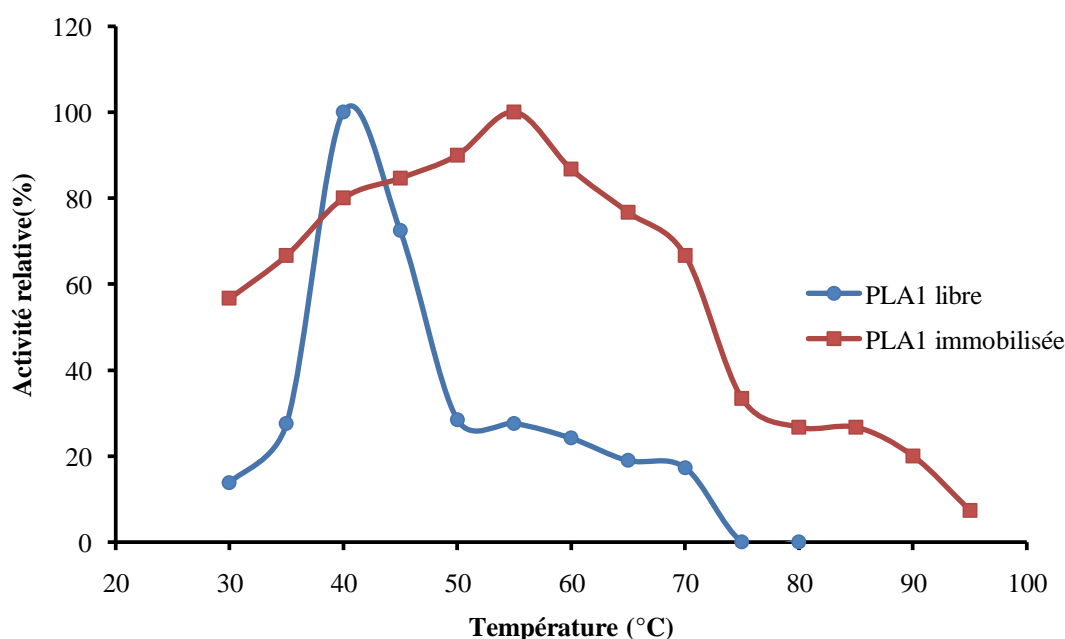


Figure III. 5- Evolution de l'activité phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée en fonction de la température (pH 7)

L'immobilisation de l'enzyme sur la bentonite est supposée être un bon moyen pour préserver la structure tertiaire de l'enzyme, causé vraisemblablement par les effets de milieu réactionnel. L'activité significativement élevée de la PLA1 immobilisée enregistrée à des températures inférieures à 55 °C est probablement le résultat de l'adsorption des enzymes par la bentonite. Un résultat similaire est obtenu par Chang et Juang (2005) [65].

L'énergie d'activation de l'enzyme est abordée dans la section suivante nous donnera probablement une meilleure interprétation à nos résultats.

III.3.2.1.Énergie d'activation

L'énergie d'activation (E_a) exprimée en Kcal mol^{-1} représente l'énergie entre les réactifs et l'état de transition (ou complexe activé) d'une réaction donnée [66]. 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 relative de l'enzyme, (T) la température en Kelvin, (R) la constante des gaz parfaits ($R = 1.987 \text{cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$).

Pour les besoins de la détermination de E_a , l'activité relative 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 ($-E_a/R$) obtenue à partir de la représentation linéaire de $\ln V$ en fonction de $1/T$.

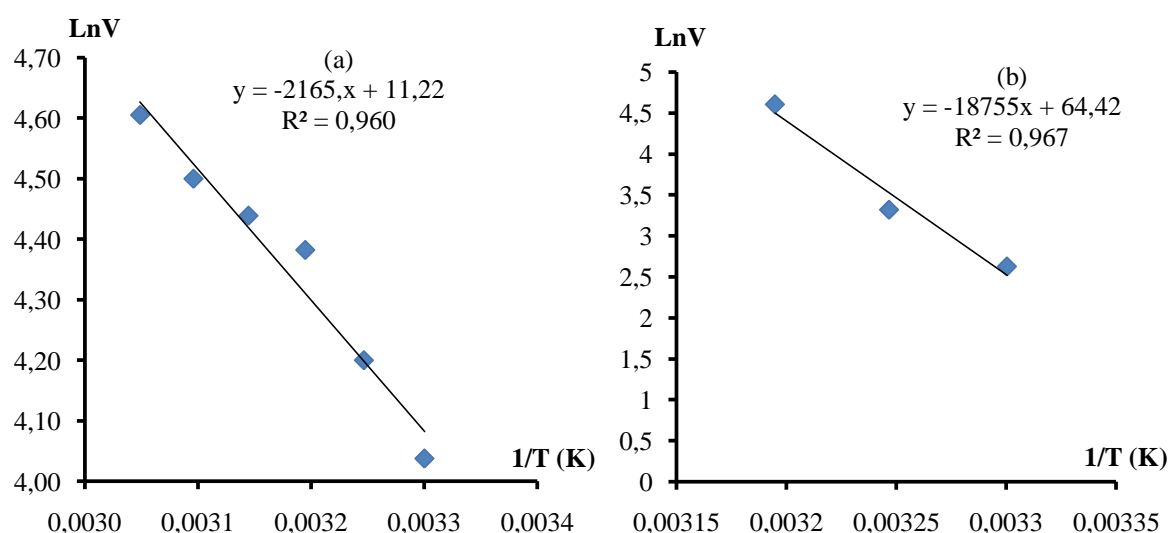


Figure III. 6- Représentation d'Arrhenius de l'énergie d'activation de la PLA1 immobilisée (a) et libre (b)

L'énergie d'activation (E_a) de la catalyse pour la phospholipase libre et immobilisée avec les équations des régressions est représentée par la figure III.6. L'immobilisation de la PLA1 a diminué l' E_a de 37,27 à 4,30 kJ mol^{-1} , ce qui a conduit à une meilleure activité catalytique de l'enzyme. 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. Nos résultats sont corroborés par ceux rapportés par Dong et al. (2012) [64] et Zeng et al. (2009) [67].

III.3.3.3. Stabilité thermique

La stabilité thermique de la PLA1 libre et immobilisée est représentée dans la figure III-7. La PLA 1 immobilisée conserve 72 % de son activité catalytique après 1 heure d'incubation à 65 °C, et 60 % à 70 °C après 1 heure d'incubation alors que la PLA1 libre ne conserve que 46,81 % de son activité initiale à 65 °C et 30 % de son activité initial à 70 °C.

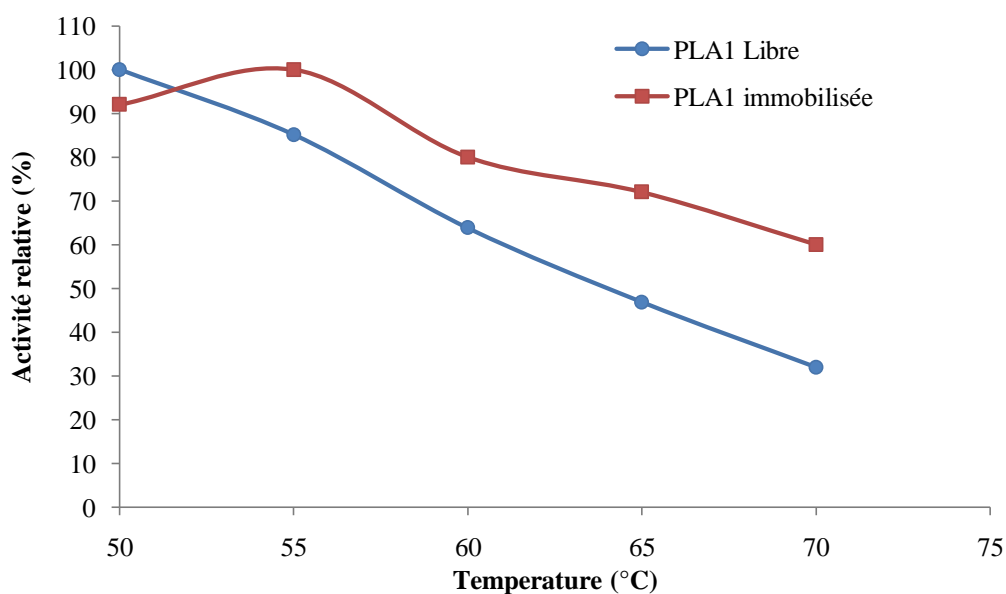


Figure III. 7– Stabilité thermique de PLA1 libre et immobilisée sur la bentonite

Dans cette étude, la PLA1 a été immobilisée par adsorption sur la bentonite. L'augmentation de la stabilité thermique est due à leur attachement au support qui compense partiellement la perte d'activité enregistrée par l'enzyme libre [12]. L'augmentation de la stabilité thermique implique une réduction de la réaction de dénaturation. Des résultats similaires ont été rapportés par Dianyu et al (2012) [68] pour la PLA1 immobilisée sur l'alginate, la gélatine et le chitosan.

III.3.3.Effet du pH sur l'activité lipasique de la PLA1

Les résultats obtenus présentés sur la figure III.8, 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 7, puis elle diminue. Ce qui suggère que le pH optimum de PLA1 est de 7. Néanmoins à pH 5, l'activité lipasique de l'enzyme libre est nulle tandis qu'elle atteint 20 % de son activité maximale après son immobilisation. Cela est dû au renforcement de la structure de l'enzyme par son immobilisation, ce qui la rend rigide et plus stable.

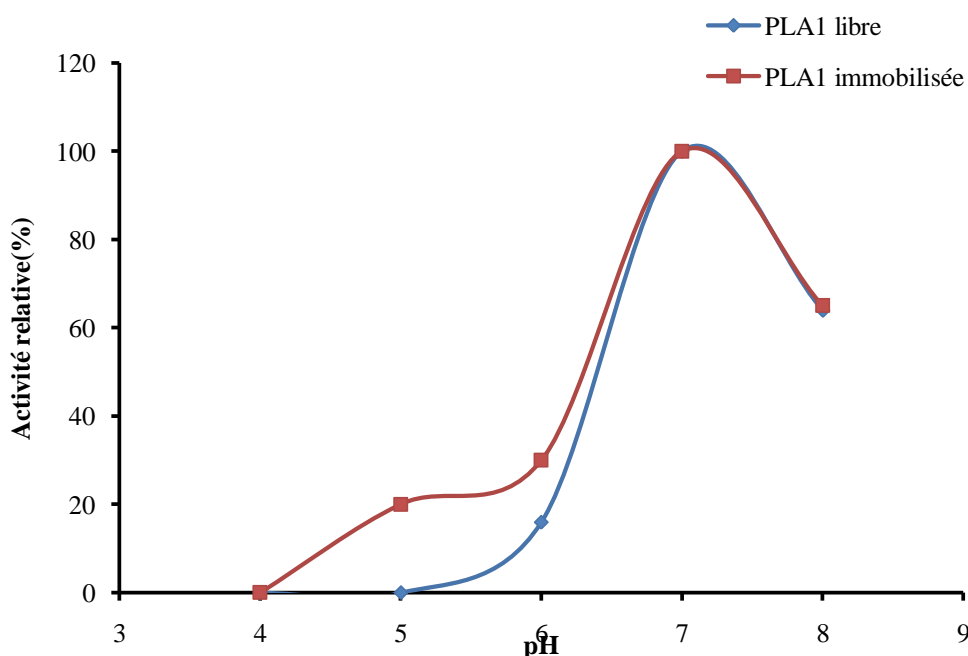


Figure III. 8- Evolution de l'activité lipasique de la PLA1 immobilisée et libre en fonction du pH (à T 40 °C)

On remarque que le pH optimum est de 7, valeur plus élevée par rapport aux études rapportées par Yang et al. (2008) [52] qui est de 5,0 pour la PLA1 purifiée. Selon Mishra et al. (2009) [69], la variation de l'activité en fonction du pH est beaucoup plus étroite que celui rapporté par Novozymes [4]. Il est important de noter que l'enzyme immobilisée est plus active en raison de son activité spécifique plus élevés que l'enzyme libre (figure III.8).

III.3.4. Effet de la température sur l'activité lipasique de la PLA1

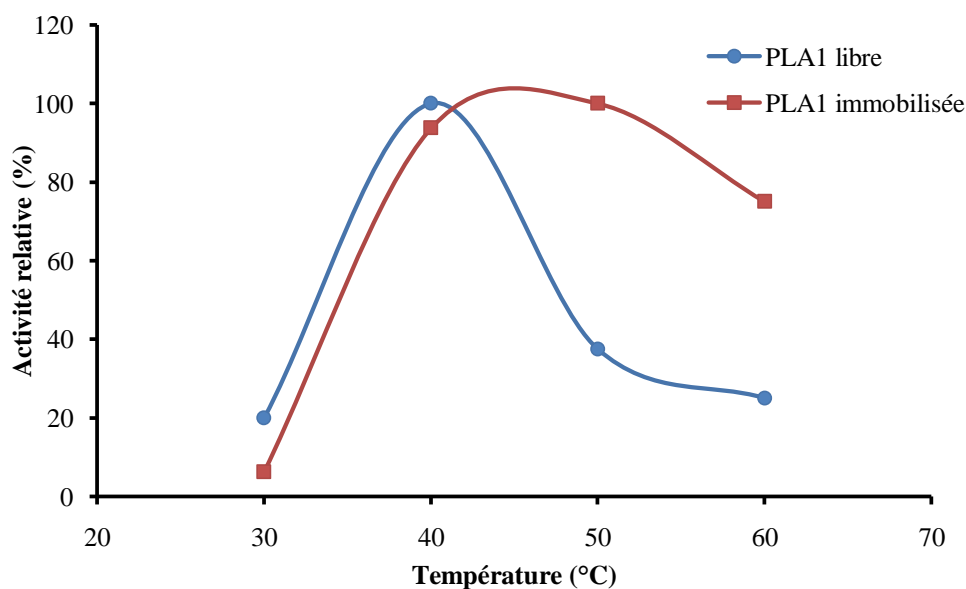


Figure III. 9- Evolution de l'activité lipasique de la PLA1 immobilisée et libre en fonction de la température (pH 7)

Selon les résultats de la figure III.9 ; l'immobilisation déplace la température optimale de la PLA1 de 40 C° à 55 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 diffusionff du substrat aux températures élevées. C'est pour cela que les enzymes immobilisées gardent une activité catalytique à des températures élevées [10].

III.4.Comparaison entre l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1

III.4.1.Activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme libre

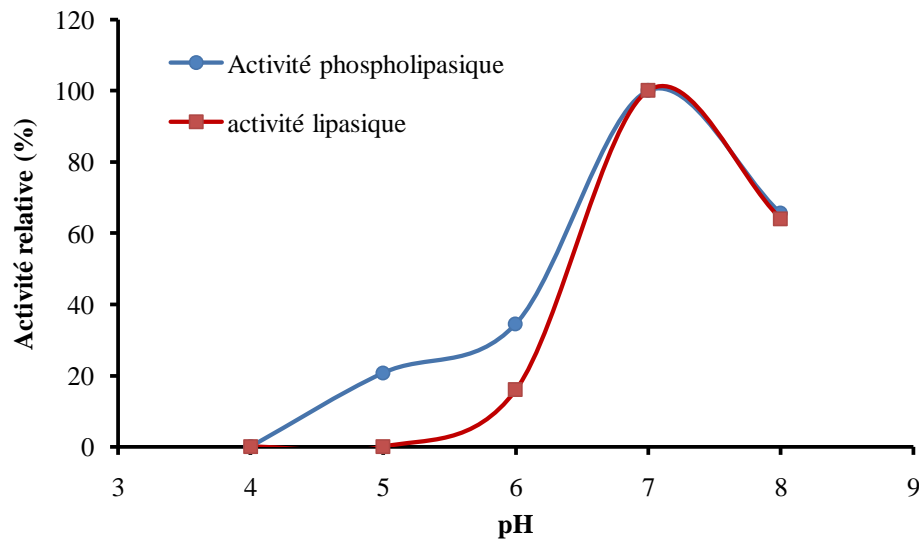


Figure III. 10- Evolution de l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1 libre en fonction du pH

Les figures III.10 et III.11 représentent une comparaison entre l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme libre en fonction du pH et de la température. 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, tandis qu'elle n'exprime pas son activité lipasique. On peut stipuler que c'est pour cette raison que le producteur (Novozymes) [4] recommande l'utilisation de l'enzyme à pH 5, et ceci pour éviter la perte du rendement qui peut être provoquée par l'hydrolyse des TAG par l'enzyme si le procédé est opéré à pH 7.

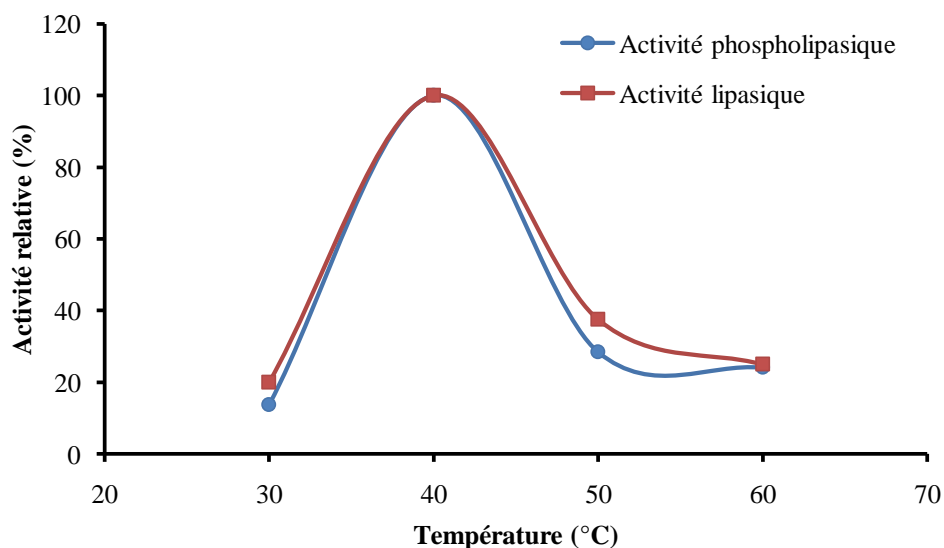


Figure III. 11- Evolution de l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1 libre en fonction de la température

En ce qui concerne la température, on peut constater que cette dernière n'affecte pas l'allure de la courbe des deux activités potentiellement exprimées par l'enzyme, mais l'activité phospholipasique prédomine toujours sur l'activité lipasique.

III.4.2. Activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme immobilisée

Les figures III.12 et III.13 représentent une comparaison entre l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme immobilisée. Pour la PLA1 libre, l'activité lipasique de l'enzyme immobilisée domine l'activité phospholipasique à pH 5. (Voir figure III.12) Au-delà de cette valeur, l'activité phospholipasique reprend le dessus.

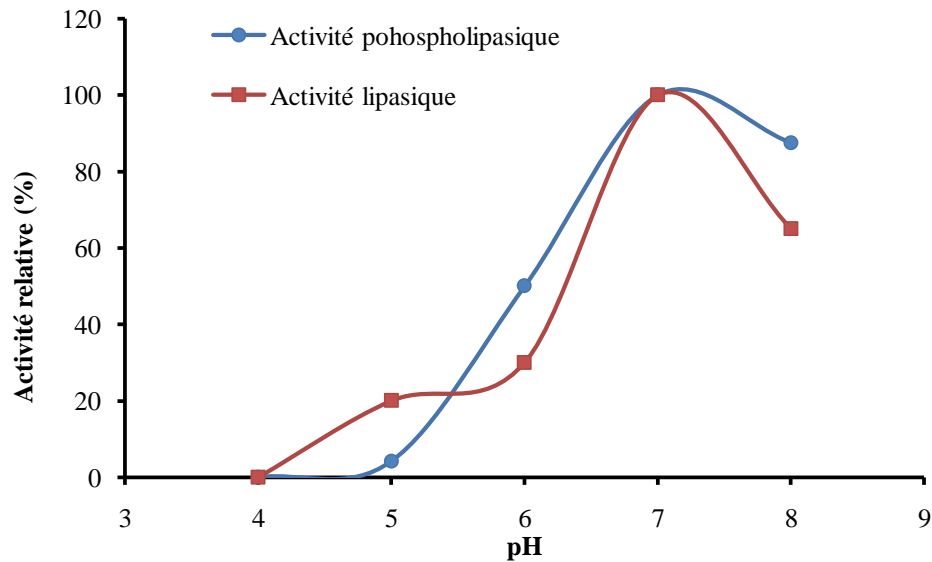


Figure III. 12- Evolution de l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1 immobilisée en fonction du pH.

En ce qui concerne l'effet de la température figure III.13, on peut constater que l'immobilisation a pu permettre à l'enzyme de résister aux températures élevées, autrement dit, la PLA1 est devenue plus stable qu'à son état libre.

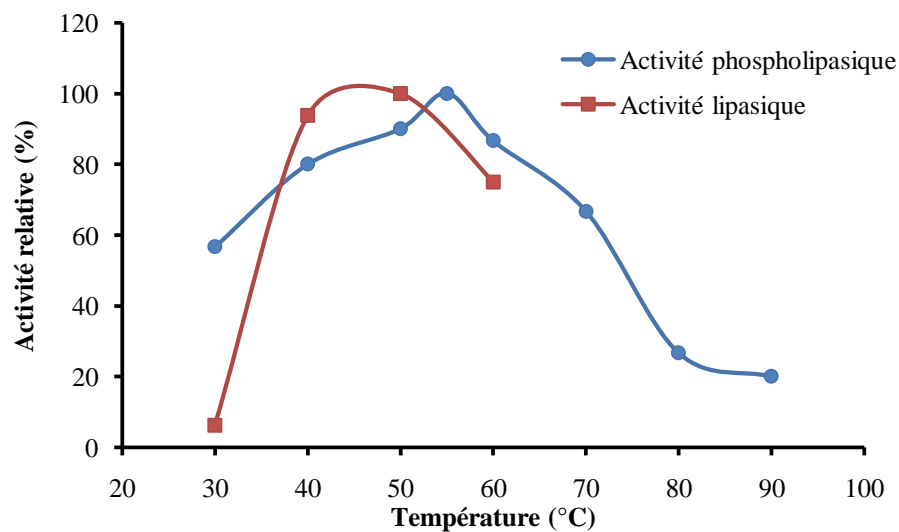


Figure III. 13- Evolution de l'activité phospholipasique et lipasique de la PLA1 immobilisée en fonction de la température.

III.5.Détermination des paramètres cinétiques

La Comparaison de la valeur de K_m pour l'enzyme libre et immobilisé peut fournir des informations quant aux interactions entre l'enzyme et son support [17]. L'effet de la concentration en substrat sur la vitesse de réaction initiale (v) catalysée par PLA1 libre et immobilisée a été étudié en utilisant la lécithine comme substrat.

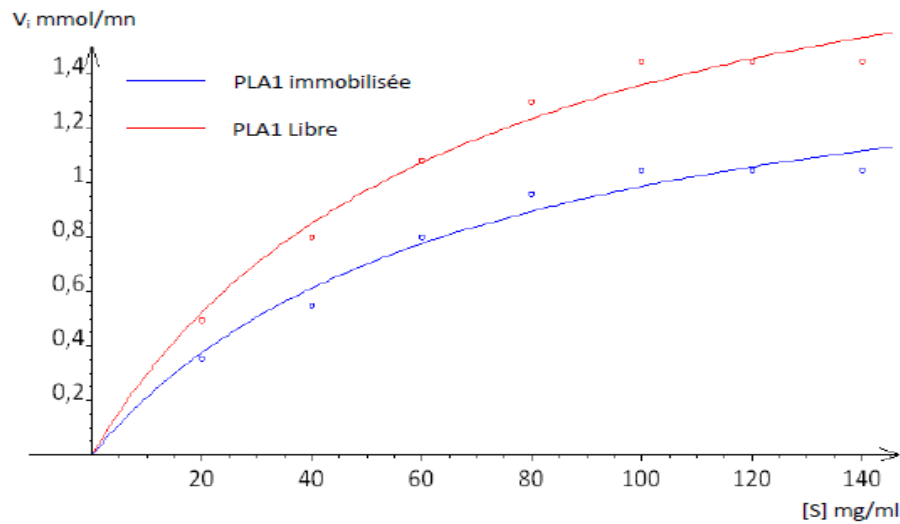


Figure III. 14-Représentation graphique de la cinétique de Michaelis-Menten.

La constante de Michaelis(K_m) et la vitesse maximale de réaction (V_{max}) de PLA1 libres et immobilisées ont été calculées à partir du modèle de Michaelis-Menten (Figure III.14) et de Lineweaver-Burk (Figure III.15).

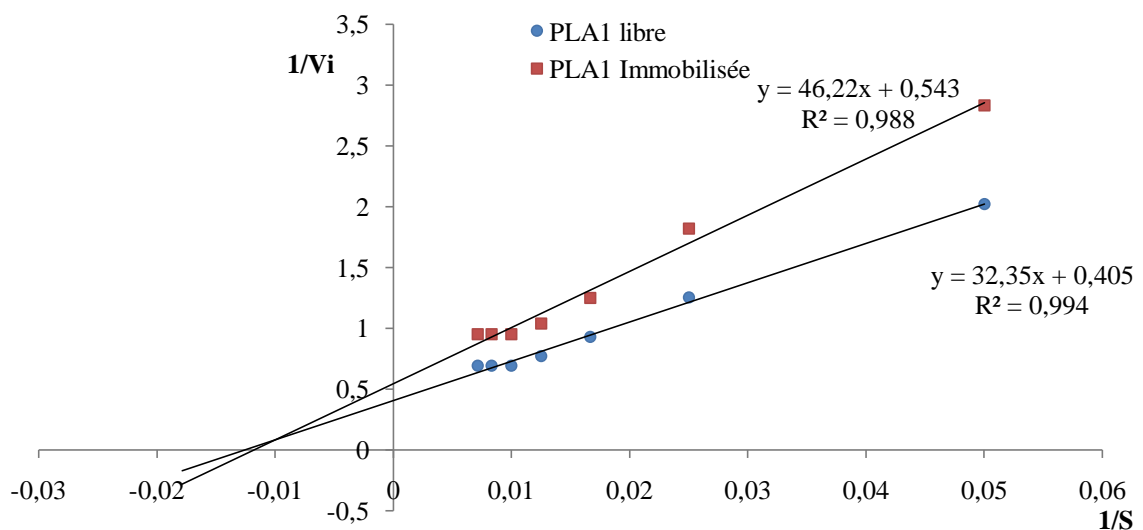


Figure III. 15-Représentation de Lineweaver-Burk pour la PLA1 libre et immobilisée.

Les valeurs obtenues pour V_{max} sont respectivement de 2,47 et de 1,84 mmole/min pour PLA1 libre et immobilisée et la valeur de K_m est de 79,88 pour PLA1 libres et 85,12 mg /mL pour l'immobiliser.

La comparaison de la valeur du K_m de l'enzyme libre et immobilisée nous fournit des informations au sujet des interactions entre l'enzyme et son support [44]. 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 certain auteur [65] 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 diffusionnelle du substrat près des particules du support.

Le résultat a montré 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 [67].

III.6. 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 initiale de phosphore dans l'huile soja est de 186.15 mg/kg. La température et la valeur du pH ont été maintenues dans l'intervalle 50-55 °C pour la température et 5.5-6.0 pour le pH, afin de réduire au minimum la désactivation thermique des enzymes, et pour conserver la vitesse maximale de réaction. Les résultats représentant les taux de phosphore en fonction du temps d'hydrolyse sont représentés dans la figure III.16.

La PLA1 libre a exhibé un fort déclin dans la teneur de phosphore après un temps d'incubation qui a atteint 8.6 mg/kg après 5 heures et 6.5 mg/kg après 7 heures d'incubation. Tandis que dans le cas de la PLA1 immobilisée la teneur du phosphore n'est réduite à 9 mg/kg qu'après 7 heures d'incubation.

Les résultats indiquent que l'enzyme libre était plus mobile et plus accessible aux phospholipides et se stabilisent malgré un modeste prolongement de la durée d'incubation.

Bien que la PLA1 immobilisé fût moins efficace à l'hydrolyse des phospholipides comparativement à la PLA1 libre, la teneur de phosphore est de 9 mg/kg après 7 heures pour la PLA1 immobilisée, avec bien sur l'avantage que représente l'immobilisation telle que la possibilité de la réutilisation de l'enzyme.

Clausen [70] a appliqué la phospholipase A1 libre (Lecitase Novo) pour réduire la teneur de phospholipide dans l'huile de graine de colza à une teneur en phosphore inférieur à 10 mg/kg, sous les conditions de 3 heures de durée, de pH5 et 40-45 °C pour l'intervalle des températures. Yang et al [15] a employé la phospholipase A1 microbienne de *Thermomyces lanuginosus/Fusarium oxysporum* dans le dégomme de l'huile de soja pour atteindre un taux de phosphore à moins de 10 mg/kg (6.3 heures, de pH 4.8-5.1). Sheelu [17] a employé PLA1 au dégomme d'huile de son de riz pour diminuer la teneur de phosphore de 400 mg/kg à 50-70 mg/kg en un cycle.

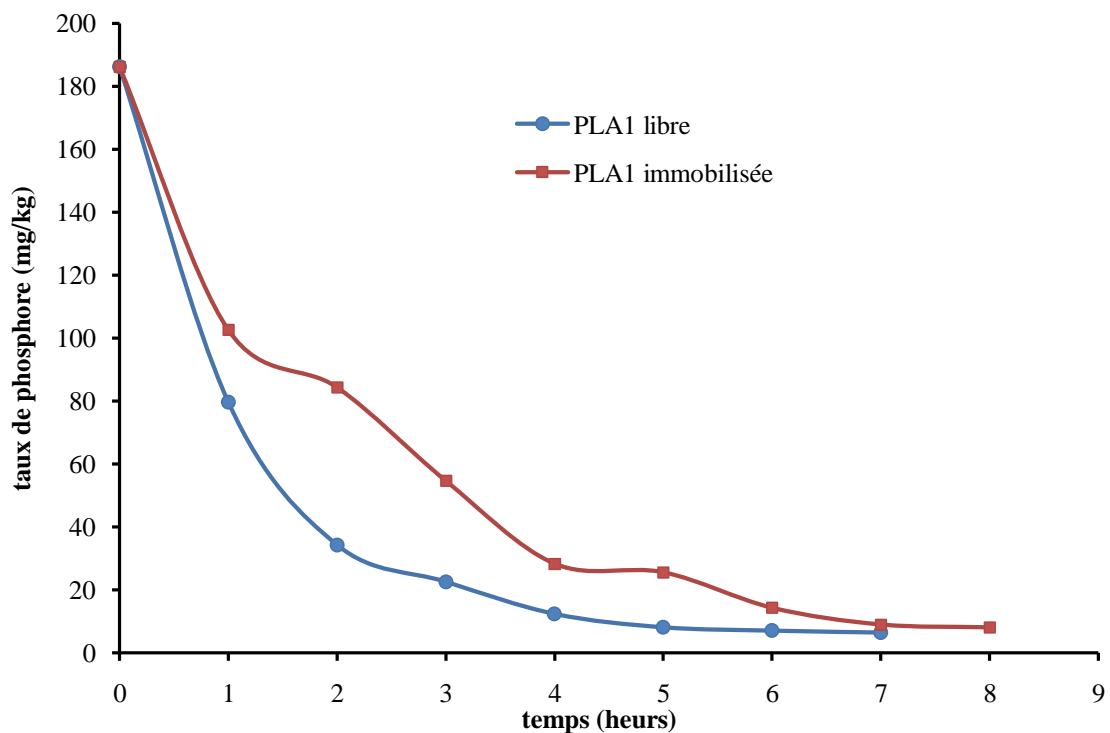


Figure III. 16-variation du taux de phosphore dans l'huile traitée par l'enzyme libre et immobilisée.

Conclusion générale

Conclusion

Le travail présenté dans ce rapport concerne principalement l'étude de l'immobilisation d'une phospholipase sur la bentonite, et la détermination de l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme, avec pour principal objectif, la détermination de ses paramètres optimums de catalyse, et la caractérisation du support utilisé pour l'immobilisée. Une partie de ce travail a été consacrée à une application dans le dégommeage des huiles alimentaires.

L'analyse minéralogique par la diffraction des rayons X (DRX) montre que la bentonite utilisée est caractéristique d'une présence d'une forte teneur en argile montmorillonitique, et un pourcentage élevé en Si. La forte teneur en montmorillonite a été confirmée par l'analyse spectrale par spectroscopie (IRTF), par l'apparition d'un pic intense à 3633 et 3458 cm^{-1} qui caractérise la présence de la montmorillonite.

Les résultats de l'étude de l'immobilisation de l'enzyme sur la bentonite ont montré que le taux d'immobilisation est de 70 %, l'immobilisation a été confirmée par l'analyse spectrale par spectroscopie infrarouge des échantillons de l'enzyme libre et immobilisée.

L'étude des paramètres physico-chimiques (pH et température) de l'enzyme libre et immobilisée nous a montré que l'immobilisation n'avait pas d'effet sur le pH optimum de l'enzyme qui est de 7, en revanche, l'optimum de la température c'est déplacé de 40 à 55 °C pour l'activité phospholipasique et de 40 à 50 °C pour l'activité lipasique.

Un autre résultat à mettre en évidence, est l'activité phospholipasique de la PLA1 qui prédomine toujours son activité lipasique. En effet, la PLA1 exhibe une activité phospholipasique et lipasique, qu'elle soit libre ou immobilisée.

Nous avons pu remarquer aussi que l'immobilisation avait un effet significatif sur l'efficacité catalytique de la PLA1, vu qu'elle a diminué considérablement l'énergie d'activation de l'enzyme de 37,27 à 4,30 kJ mol^{-1} .

L'affinité de l'enzyme a été légèrement affectée par l'immobilisation vu qu'il y a eu une augmentation de K_m de 79,88 mg /mL pour PLA1 libres et 85,12 mg /mL pour PLA1 immobilisée, et une diminution de la vitesse maximale (V_{max}) qui est de valeur de 2,47 mmole/min pour PLA1 libre et 1,84 mmole/min pour PLA1 immobilisée.

L'application de l'enzyme libre et immobilisée nous a montré que, le dégomme avec l'enzyme libre a permis de réduire le taux de phosphore dans l'huile brute a 6.5 mg/kg après 7 heures d'incubation et 9 mg/kg après 7 heures d'incubation pour l'enzyme immobilisée.

Les résultats qu'on a pu obtenir dans ce travail montrent que la bentonite possède un potentiel prometteur d'être appliqué comme support d'immobilisation des enzymes, du fait que nous avons pu atteindre un taux d'immobilisation de 70 % en protéines enzymatique.

Références bibliographiques

Bibliographies

1. Guisan, J.: Immobilization of enzymes and cells 2nd edn. Humana Press (2006)
2. Ghiaci, M.: Enzyme immobilization: Part 2: Immobilization of alkaline phosphatase on Na-bentonite and modified bentonite. *Applied Clay Science* 43, 308–316 (2009)
3. Grim, R., Guven, N.: Bentonites Geology, mineralogy, properties and uses. Elsevier Science (2011)
4. Nielsen, M., Cowan, D.: Lecitase Ultra: Enzymatic Degumming Manual. Novozymes (2003)
5. Illanes, A.: Enzyme biocatalysis principles and applications. Springer (2008)
6. Vial, S.: Immobilisation d'enzymes dans des hydroxydes doubles lamellaires. Réalisation de biocapteurs pour la détection de polluants organiques., Université Blaise Pascal (2005)
7. Zubay, G., Parson, W., Vance, D.: Principles of biochemistry. Wm. C. Brown (1995)
8. Copeland, R.: Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis 2nd edn. Wiley (2000)
9. Krajewska, B.: Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 126–139 (2004)
10. Ye, P., Jiang, J., Xu, Z.: Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly (acrylonitrile-co-maleic acid) membrane surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60, 62–67 (2007)
11. Jarrar, H.: Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles., École nationale supérieure de chimie, Montpellier (2001)
12. Ulbrich-Hofmann, R.: Phospholipases used in lipid transformations. In : *Enzymes in Lipid Modifications*. Wiley-VCH (2000) p. 219– 62
13. Casado, V., Martín, D., Torres, C., Reglero, G.: Phospholipases in Food Industry: A Review. In : *Lipases and Phospholipases* 861. Humana Press (2012) 495–523
14. Guo, Z., Vikbjerg, A., Xu, X.: Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnology Advances* 23, 203–259 (2005)
15. Yang, J., Wang, Y., Yang, B., Mainda, G., Guo, Y.: Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase. *Food Technology and Biotechnology* 44, 101 (2006)
16. Sandoval, G.: Lipases and phospholipases: methods and protocols. Humana Press (2012)

17. Sheelu, G., Kavitha, G., Nitin W, F.: 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 (2008)
18. Tanaka, A.: *Industrial application of immobilized biocatalysts*. Dekker (1993)
19. Illanes, A., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, M., Wilson, J.: *Heterogeneous Enzyme Kinetics*. In : *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer Science (2008) 155 – 203
20. Whitehurst, R., Oort, M.: *Enzymes in food technology* 2nd edn. Wiley-Blackwell (2010)
21. Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U. T.: *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Wiley-VCH, Weinheim (2005)
22. Eijsink V, G., Bjork, A., Gaseidnes, S., Sirevag, R., Synstad, B., Van den, B., Vriend, G.: Rational engineering of enzyme stability. *J Biotechnol* 113, 105-120 (2004)
23. Bugg, T.: *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry* 2nd edn. Blackwell Pub (2004)
24. Liu, N., Wang, Y., Zhao, Q., Cui, C., Fu, M., Zhao, M.: Immobilisation of lecitase® ultra for production of diacylglycerols by glycerolysis of soybean oil. *Food Chemistry* 134, 301-307 (2012)
25. Marangoni, A.: *Enzyme kinetics : a modern approach*. John Wiley & Sons (2003)
26. Bisswanger, H.: *Enzyme kinetics: principles and methods* 2nd edn. Wiley-VCH (2008)
27. Datta, S., Christena, L., Sriramulu, Y.: Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* 3, 1–9 (2012)
28. Akoh, C., Min, D.: *Food lipids: chemistry, nutrition, and biochemistry* 2nd edn. M. Dekker (2002)
29. Cao, L.: *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design*. Wiley-VCH (2005)
30. Besq, A., Malfoy, C., Pantet, A., Monnet, P., Righi, D.: Physicochemical characterisation and flow properties of some bentonite muds. *Applied Clay Science*(23), 275-286 (2003)
31. Bergaya, F.: *Handbook of Clay Science: Developments in Clay Science*, 1. Elsevier Ltd. (2006)
32. Davarcioglu, B.: Spectral characterization of nonclay minerals found in the clays (Central Anatolian-Turkey). *International Journal of the Physical Sciences* 6 (2011)

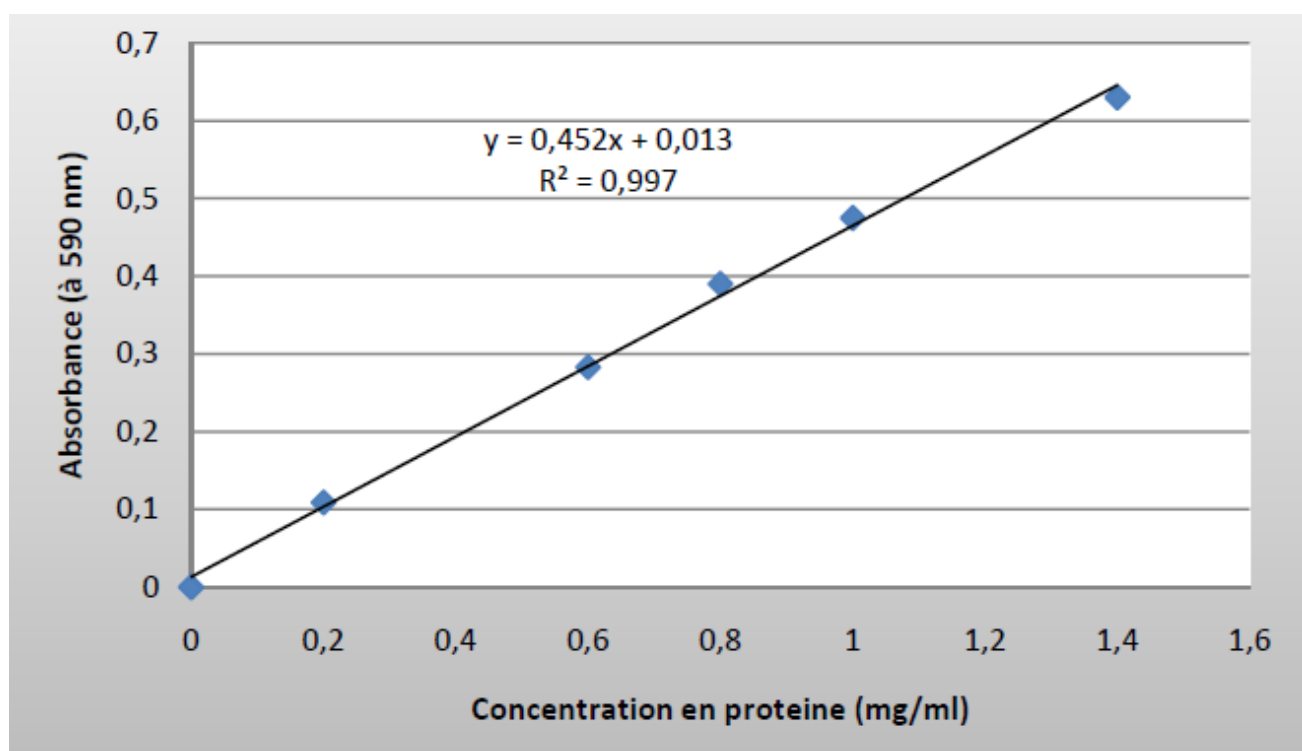
33. Luckham, P., Rossi, S.: Colloidal and rheological properties of bentonite suspensions *Adv. Colloid Interface Sc*(82), 43-92 (1999)
34. Holtzer, M., Bobrowski, A., Żymankowska-Kumon, S.: Temperature influence on structural changes of foundry bentonites. *Journal of Molecular Structure* 1004, 102-108 (2011)
35. Boukerroui, A.: Etude d'une nouvelle méthode d'activation chimique des bentonites : mise en évidence et applications.. Thèse doctorat, USTO , Oran (2002)
36. Öztürk, N., Tabak, A., Akgöl, S., Denizli, A.: Reversible immobilization of catalase by using a novel bentonite-cysteine (Bent-Cys) microcomposite affinity sorbents. *Colloid Surface A* 322, 148-154 (2008)
37. Scherer, R., Oliveira, J. V., Pergher, S., Oliveira, D.: Screening of supports for immobilization of commercial porcine pancreatic lipase. *Mat. Res.* 14 (2011)
38. Sedaghat, M., Ghiaci, M., Aghaei, H., Soleimanian-Zad, S.: Enzyme immobilization. Part 3 Immobilization of α -amylase on Na-bentonite and modified bentonite. *Appl Clay Sci* 46, 125-130 (2009)
39. Yeşiloğlu, Y.: Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Process Biochemistry* 40, 2155–2159 (2005)
40. Ghiaci, M., Aghaei, H., Soleimanian, S., Sedaghat, M.: Enzyme immobilization: Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Applied Clay Science* 43, 289–295 (2009)
41. Pifferi, S.: Immobilization of a pectinlyase from *Aspergillus niger* for application in food technology. *Enzyme Microb Technol* 17, 729-738 (1995)
42. Miletia, N., Bos, C., Loos, K.: Immobilization - A route for improving enzyme performance. In : *Polymeric Materials. Research Signpost* (2009) 131–153
43. Secundo, F., Miehé-Brendlé, J., Chelaru, C., Ferrandi, E., Dumitriu, E.: Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Microporous and Mesoporous Materials* 109, 350–361 (2008)
44. Trevan, M.: Enzyme Immobilization by Adsorption. In : *New Protein Techniques*. Springer (1988) 481–489
45. Choukri, A., Kinany, M., Gibon, V., Tirtiaux, A., Jamil, S.: Improved oil treatment conditions for soft degumming. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78, 1157–1160 (2001)
46. Matthäus, B.: Oil Technology. In : *Technological Innovations in Major World Oil Crops, Volume 2*. Springer New York (2012) 23–92

47. Dijkstra, A.: Enzymatic degumming. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 1178-1189 (2010)
48. Jahani, M., Alizadeh, M., Pirozifard, M., Qudsevali, A.: Optimization of enzymatic degumming process for rice bran oil using response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83, 653-658 (2008)
49. Dahlen, J.: Process of producing glyceride oil having a low content of nonhydratable phosphatides. United States patent (2000)
50. Yang, B., Wang, Y.-H., Yang, J.-G.: Optimization of enzymatic degumming process for rapeseed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83, 653–658 (2006)
51. Singh, D., Rezac, M. E., Pfromm, P. H.: Partial hydrogenation of soybean oil with minimal trans fat production using a Pt-decorated polymeric membrane reactor. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 86(1), 93–101 (2009)
52. Yang, B., Zhou, R., Yang, J.-G., Wang, Y.-H., Wang, W.-F.: Insight into the Enzymatic Degumming Process of Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85, 421–425 (2008)
53. Maria, L., Vind, J., OxenbÄll, K., Svendsen, A., Patkar, S.: Phospholipases and their industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 290–300 (2007)
54. Dean, J.: *Lange's Handbook Of Chemistry*. McGraw-Hill, Inc (1999)
55. Stuart, B.: *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. J. Wiley (2004)
56. Kenkel, J.: *Analytical chemistry for technicians 3rd edn*. Lewis Publishers (2003)
57. Acree, W.: *Handbook of Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (2005)
58. AOCS, C.: *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, Ca 12-55. (1997)
59. Holtzer, M., Bobrowski, A., Grabowska, B.: montmorillonite: a comparison of methods for its determination in foundry bentonites. *metalurgija II*(50), 119-122 (2011)
60. Sakizci, M., Alver, B., Alver, Ö., Yörükoğullari, E.: Spectroscopic and thermal studies of bentonites from Ünye, Turkey. *Journal of Molecular Structure* 969, 187-191 (2010)
61. Erdem, B., Özcan, A., Özcan, A.: Adsorption and solid phase extraction of 8-hydroxyquinoline from aqueous solutions by using natural bentonite. *Applied Surface Science* 256, 5422-5427 (2010)

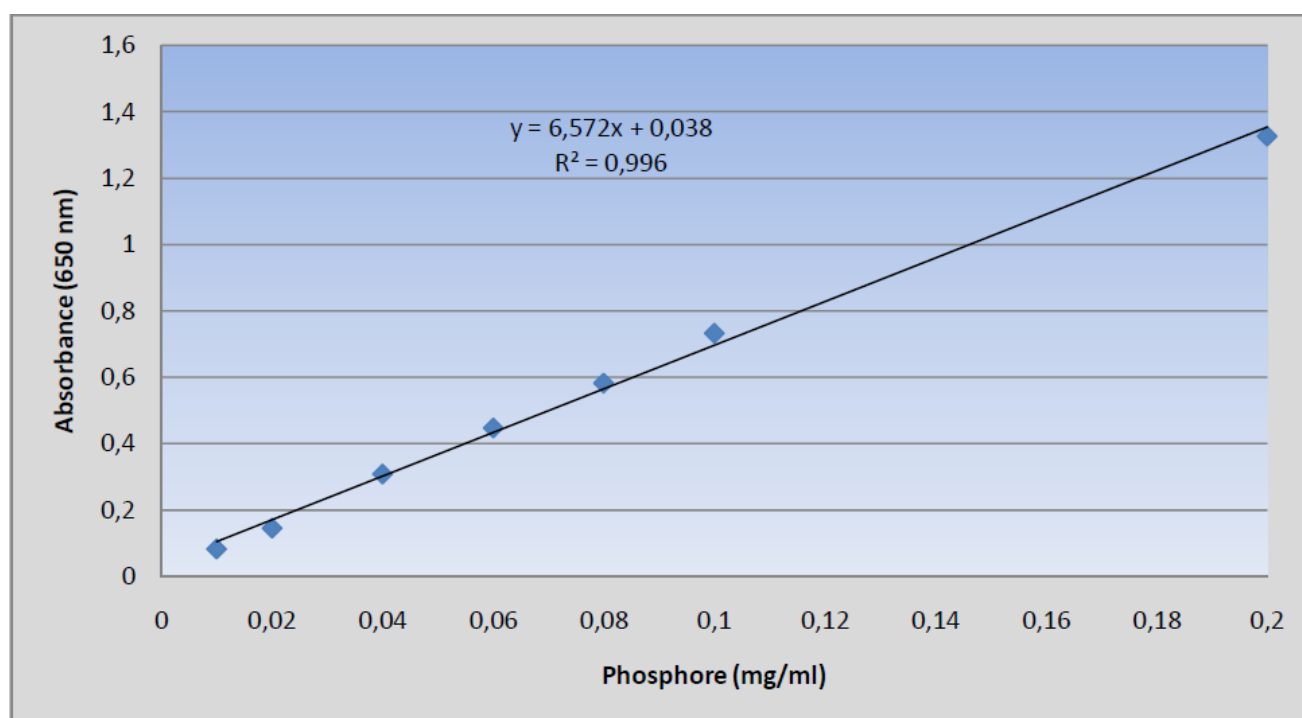
62. Natalello, A., Ami, D., Brocca, S., Lotti, M., Doglia, S. M.: Secondary structure, conformational stability and glycosylation of a recombinant *Candida rugosa* lipase studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochem. J.* 385, 511–517 (2005)
63. Perevedentseva, E., Cai, P. J., Chiu, Y. C., Cheng, C. L.: Characterizing protein activities on the lysozyme and nanodiamond complex prepared for bio applications. *Langmuir* 27, 1085–1091 (2011)
64. Dong, H., Li, J., Li, Y., Hu, L., Luo, D.: Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite. *Chemical Engineering Journal* 181-182, 590-596 (2012)
65. Chang, M.-Y., Juang, R.-S.: Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan–clay composite immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 75–82 (2005)
66. Kumari, A., Mahapatra, P., Kumar, G., Banerjee, R.: Comparative study of thermostability and ester synthesis ability of free and immobilized lipases on cross linked silica gel. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31, 291–298 (2007)
67. Zeng, H.-y., Liao, K.-b., Deng, X., Jiang, H., Zhang, F.: Characterization of the lipase immobilized on Mg–Al hydrotalcite for biodiesel. *Process Biochemistry* 44, 791-798 (2009)
68. Yu, D., Jiang, L., Li, Z., Shi, J., Xue, J., Kakuda, Y.: Immobilization of Phospholipase A1 and its Application in Soybean Oil Degumming. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89, 649–656 (2011)
69. Mishra, M., Kumaraguru, T., Sheelu, G., Fadnavis, N.: Lipase activity of Lecitase® Ultra: characterization and applications in enantioselective reactions. *Tetrahedron: Asymmetry* 20, 2854–2860 (2009)
70. Clausen, K.: Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103, 333–340 (2001)

Annexes

Annexe1 : Courbe d'étalonnage : dosage des protéines



Annexe2 : Courbe d'étalonnage : dosage de phosphore



Resumé

Notre présent travail a fait l'objet d'une étude sur l'immobilisation d'une enzyme libre, la phospholipase A1 (Lecitase Ultra) dérivée de l'Aspergillus oryzae/ Fusarium venenatum, sur un support minéral de bentonite. L'étude porte sur la détermination des paramètres optimaux de pH et de température avant une utilisation dans le dégommeage d'une huile alimentaire brute. L'enzyme libre et immobilisée sur le support de bentonite a été d'abord caractérisée par les méthodes physicochimiques (IRTF et la DRX) disponibles à l'université de Bejaia.

Les résultats obtenus ont montré que le pH optimum est de 7, invariable pour l'enzyme libre et immobilisée. Pour la température, la valeur optimum est de 40 °C pour l'enzyme libre et est de 55 °C pour l'enzyme immobilisée. Ces résultats sont justifiés par la valeur de l'énergie d'activation obtenue et qui est plus basse pour l'enzyme immobilisée (diminution de 37,27 à 4,30 et kJ mol⁻¹). La cinétique enzymatique appliquée aux résultats a montré que pour le paramètre cinétique de Vmax, les valeurs sont de 2,47 mmole/min pour PLA1 libre et 1,84 mmole/min pour l'immobilisée. La valeur de Km est de 79,88 pour PLA1 libres et 85,12 mg /mL pour l'immobilisée.

Au cours du dégommeage de l'huile brute par l'enzyme libre et immobilisée, nous avons obtenu un taux de phosphore de 6.5 mg/kg après 7 heures d'incubation pour l'enzyme libre et 9 mg/kg après 7 heures d'incubation pour l'enzyme immobilisée.

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

Abstract

Our present work was made the aim of a study on the immobilization of a free enzyme, the phospholipase A1 (Lecitase® Ultra) derived from Aspergillus oryzae/Fusarium venenatum, on a mineral of bentonite. The study relates to the determination of the optimum parameters of pH and temperature before a use in degumming of crude edible oil. The free enzyme and immobilized on the bentonite support were initially characterized by the physico-chemical methods (IRTF and the DRX) available on the university of Bejaia.

The results obtained showed that the optimum pH is 7, unchanging for the free and immobilized enzyme. For the temperature, the optimum value 40°C for the free enzyme and 55°C for the immobilized enzyme. These results are justified by the value of energy activation obtained and which is lower for the immobilized enzyme (reduction of 37,27 to 4,30 kJ mol⁻¹). The enzymatic kinetics applied to the results showed that for the kinetic parameter of Vmax, the values are 2,47 mmole/min for free PLA1 and 1,84 mmole/min for immobilized. The value of km is 79,88 for free PLA1 and 85,12 mg /mL for immobilized.

During the degumming of crude oil by the free and immobilized enzyme, we obtained a phosphorus rate of 6.5 mg/kg after 7 h of incubation for the free enzyme and 9 mg/kg after 7 h of incubation for the immobilized enzyme.

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