

MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme :

INGENIEUR D'ETAT EN BIOLOGIE

Spécialité : CONTRÔLE DE QUALITE ET ANALYSES

Présenté par :

AKROUCHE ABDESLAM

CHERFA NASSIM

Thème

DEGOMMAGE ENZYMATIQUE DE L'HUILE BRUTE DE SOJA :

Optimisation et Modélisation

Soutenu le 06 Juin 2013 devant le jury composé de :

M. K. MADANI Maître de conférences – UAMB	Président
M. D.E. KATI Maître assistant – UAMB	Promoteur
M. B. TIDJET Ingénieur Recherche et Développement - Cevital – Bejaia	Co-promoteur
Mme. O. SOUFI Maître assistant – UAMB	Examinatrice
Mme. S. FELLA Maître assistant – UAMB	Examinatrice

Remerciements

Nous tenons d'emblée à exprimer notre reconnaissance à Monsieur KATI Dj.E d'avoir accepté de nous encadrer et tenons à lui présenter notre profonde gratitude pour la confiance qu'il a mise en nous, sa disponibilité et son engagement depuis le tout début .

Nos remerciements les plus vifs vont également à Monsieur HADJAL S., directeur Recherche et Développement chez Cevital (Bejaia) pour la proposition de cette étude et ses conseils, sans lui ce travail n'aurait pu voir le jour. Nous tenons aussi à remercier toute son équipe à commencer par notre tuteur : Monsieur TIDJET B. qui nous a accompagné tout au long de notre travail et permis une grande liberté, nous permettant ainsi d'acquérir une expérience très enrichissante, nous ne saurons vous remercier assez pour votre contribution à la concrétisation de ce projet. Nous remercions aussi Messieurs ALLIANE K., BOUKEROUI K, et ZIANE M.H. pour leurs nombreuses explications, conseils, encouragements et entière disposition. Sans oublier bien évidemment la gentillesse et l'amabilité de Fatma.

Travailler au sein de votre équipe durant ce stage a été pour nous un grand honneur, nous n'oublierons jamais la gentillesse et le dévouement dont vous avez fait part. Nous tenons à vous exprimer toute notre gratitude.

Nous exprimons notre vive reconnaissance à Monsieur MADANI K., maître de conférences et directeur du laboratoire de recherche BBBB, d'avoir accepté la présidence du jury. Sa présence dans celui-ci témoigne d'une grande gentillesse.

Nous adressons également nos remerciements à Madame SOUFI O. et Madame FELLA S. d'avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury.

Nos remerciements sont adressés aussi à Mr. Merrar M., Mr. HADJADJ B., Mr. DAHMOUNE F., Mr. CHIKHOUNE A., Mr BOUKHALFA F., ainsi que Mr. KERNANI R.

Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont soutenus et encouragés tout au long de la réalisation du présent travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents, mes sœurs ainsi que toute la famille qui m'ont soutenus et encouragés tout au long de ma formation.

Seloua, Chiki

Mon ami Nassim, ainsi que toute sa famille.

Mes amis.

Abdeslam

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de mon père

Tu es parti pour toujours, hélas ! Tu as laissé derrière toi un grand vide que rien au monde ne peut combler. Mais les souvenirs de ta bonté, ta bravoure, ton amour incommensurable pour tous, reste à jamais gravés dans nos mémoires.

Tu nous manques terriblement, et je sais que là où tu te trouves, tu nous regardes de tes yeux pétillants pleins d'amour, de bonheur, de sincérité.

A ma très chère mère qui m'a tout donné. Qui a toujours été là pour moi, et qui m'a donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'elle trouvera dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A ma grand-mère symbole de courage et de patience.

A Mes très chers frères pour leur aide, conseils et sympathie.

A notre petite fleur Liza

A toi Abdeslam et à toute ta famille

A mes meilleurs amis : Karim, Redouan, Sofian, Aimad, Mouloud, Hachemi, youba, Ahmed,

A toute la promotion 2013

A tous les êtres chers à mes yeux que je n'ai pas évoqués.

Nassim

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Partie théorique

Chapitre I: L'huile de soja

I-1- Définition	4
I-2- Composition	4
I-3- Les différents types de phospholipides.....	5

Chapitre II: Raffinage des huiles végétales

II-1- Définition du raffinage des huiles végétales	7
II-2- But du raffinage.....	7
II-3- Les différents procédés de raffinage de l'huile de soja	9
II-3-1- Procédé de raffinage chimique.....	9
II-3-1-1- Dégommage	9
II-3-1-2- Neutralisation.....	10
II-3-1-3- Lavage et séchage	11
II-3-1-4- Décoloration.....	11
II-3-1-5- Désodorisation	12
II-3-2- Procédé de raffinage enzymatique.....	13
II-4- Etude comparative des deux types de raffinage.....	14
II-4-1- Comparaison	14
II-4-2- Détermination des avantages et inconvénients	14

Chapitre III: Dégommage enzymatique

III-1- Caractérisation de l'enzyme utilisée : Lécitase® Ultra.....	17
III-1-1- Définition	17
III-1-2- Paramètres catalytiques.....	17
III-1-2-1- Influence du pH	17
III-1-2-2- Influence de la température.....	19

III-1-3- Mécanisme d'action	20
III-2- Cinétique du dégomme enzymatique utilisant la Lecitase® Ultra.....	21

Partie expérimentale

Chapitre IV: Matériels et méthodes

-IV-1- Caractéristiques de l'huile brute utilisée.....	24
-IV-2- Caractéristiques de l'enzyme utilisée	24
-IV-3- Echantillonnage de l'huile brute.....	24
-IV-4- Dégomme enzymatique à échelle laboratoire.....	24
-IV-4-1- Calcul des quantités des réactifs.....	24
-IV-4-2- Mode opératoire	26
-IV-5- Paramètres de suivi du dégomme enzymatique.....	27
-IV-5-1- Détermination de l'acidité.....	27
-IV-5-2- Dosage du phosphore	28
-IV-5-3- Détermination du pH par la méthode potentiométrique.....	30
-IV-6- Conception expérimentale.....	30
-IV-6-1- Introduction aux plans d'expériences	30
-IV-6-2- Plan de Box-Behnken pour trois facteurs.....	31
-IV-6-3- Optimisation du dégomme enzymatique.....	32

Chapitre V: Résultats et discussions

-V-1- Résultats des mesures de l'acidité	35
-V-2- Résultats détermination du pH	35
-V-3- Résultats du plan BBD	37
-V-3-1- Analyse des résultats	37
-V-3-2- Analyse de variance	38
-V-3-2-1- Coefficient de corrélation.....	38
-V-3-2-2- Modèle globale et manque d'ajustement	38
-V-3-2-3- Effets des facteurs.....	39
-V-3-3- Modèle mathématique.....	43

-V-3-4- Optimisation44

Conclusion 47

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition moyenne de l'huile de soja brute et raffinée.....	4
Tableau 2 : Constituants mineurs et contaminants de l'huile de soja à éliminer au cours du raffinage.....	8
Tableau 3 : Caractérisation des deux types de raffinages.....	14
Tableau 4 : Avantages et inconvénients du raffinage chimique et enzymatique.....	15
Tableau 5 : Domaine d'étude.....	32
Tableau 6 : Plan d'expériences BBD en valeurs codées et réelles.....	33
Tableau 7 : Résultats des mesures de l'acidité.....	35
Tableau 8 : Résultats des mesures du pH.....	36
Tableau 9 : Résultats du plan BBD en valeurs mesurées et prédites.....	37
Tableau 10 : Analyse de variance du modèle.....	39
Tableau 11 : Tableau des estimations des coefficients.....	40
Tableau 12. Solution optimale du dégomme enzymatique et comparaison aux conditions habituelles (pour 200g d'huile brute à traiter).....	44

Liste des figures

Figure 1 : Structure moléculaire et formation des phospholipides communément retrouvés dans le soja.	5
Figure 2 : Influence du pH sur la stabilité de la Lecitase Ultra.	18
Figure 3 : Influence du pH sur l'activité enzymatique de la Lecitase Ultra.....	18
Figure 4 : Influence de la température sur la stabilité de la Lecitase Ultra.....	19
Figure 5 : Influence de la température sur l'activité enzymatique de la Lecitase Ultra.....	20
Figure 6 : Mode d'action de la Lecitase Ultra (PLA ₁).....	20
Figure 7 : Isomérisation du 2-acyl-1-lysophospholipide en 1-acyl-1-lysophospholipide et action de la PLA ₁ pour la production d'un glycérophospholipide.....	21
Figure 8 : Description de l'installation du dégomme enzymatique à échelle laboratoire.....	26
Figure 9 : Illustration du plan de box-Behnken pour trois facteurs.....	32
Figure 10 : Variation du pH en fonction de la quantité de soude ajoutée.....	36
Figure 11 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues.....	38
Figure 12 : Surface de réponse de l'effet des quantités d'enzymes et de soude sur la teneur en phosphore.....	41
Figure 13 : Surface de réponse de l'effet de la quantité d'enzymes et du temps sur la teneur en phosphore.....	42
Figure 14 : Surface de réponse de l'effet de la quantité de soude et du temps sur la teneur en phosphore.....	43

Liste des abréviations

AGL: Acide gras libre.

ANOVA: ANalysis Of VAriance (analyse de variance).

AP : Acide phosphatidique.

BBD: Box-Behnken design (plan d'expériences de Box-Behnken).

EC: Enzyme Commission numbers.

FAO: Food and Agriculture Organization.

h: heure.

HPA: Hydrocarbures polycycliques aromatiques.

KD: Kilo Dalton.

Min: minutes.

P: Phosphore.

PC : Phosphatidylcholine.

PE : Phosphatidylethanolamine.

PEHD: Polyéthylène haute densité.

PET: Polytéraphthalate d'éthylène.

PH: Phospholipide hydratable.

pH: Potentiel d'hydrogène.

PI : Phosphatidylinositol.

PL: Phospholipide.

PLA₁: Phospholipase A₁.

PNH: Phospholipide non hydratable.

PPM: Partie par million, équivaut à 1 gramme par tonne.

TAG: Triacylglycérols aussi appelés triglycérides.

R²: Coefficient de corrélation.

Introduction

Les huiles et graisses végétales jouent un rôle important dans l'alimentation humaine, leur consommation variée permet, dans le respect des bonnes pratiques de conservation et d'utilisation, de rééquilibrer les apports lipidiques et de répondre aux attentes hédoniques du consommateur. Elles peuvent être consommées directement à l'état vierge, raffinées ou bien indirectement dans d'autres produits alimentaires (PAGÈS-XATART-PARÈS, 2008 ; CAHUZAC-PICAUD, 2010).

La production mondiale d'huiles et matières grasses ne cesse de croître afin de subvenir à la demande croissante des industries alimentaires en particulier au niveau des pays émergents, ainsi qu'à la hausse de l'utilisation de ces ressources pour la production du biodiesel. Ainsi, selon la FAO, la production pour l'année 2011/2012 a été estimée à 181,2 millions de tonnes (dont environ 83% d'huiles végétales) avec une croissance évaluée à 3 % pour l'année 2012/2013. Il est également intéressant de souligner que cette production repose à 90% sur six espèces végétales (palme, soja, colza, tournesol, arachide, coton) et est particulièrement dépendante de l'huile de soja qui représente 30 à 35% de la production totale d'oléagineux.

L'huile de soja, malgré ses propriétés intrinsèques tel que la richesse en protéines, ne peut être consommée à l'état brut et doit impérativement être débarrassée des composés indésirables et nuisibles à la santé du consommateur au cours d'un procédé dit de raffinage. Les phospholipides en sont un bon exemple, leur élimination s'effectue au tout début du procédé, au cours de l'étape de dégommeage.

A l'heure actuelle, deux types de dégommeage sont les plus rencontrés à échelle industrielle. Le premier dit chimique, utilise des acides. Le deuxième, enzymatique, fait appel à des enzymes et permet d'augmenter le rendement en huile, tout en réduisant les coûts d'énergie permettant ainsi d'abaisser le bilan carbone de la production et de limiter l'impact du procédé sur l'environnement. Ce procédé est utilisé par l'unité de raffinage des huiles au niveau du complexe agroalimentaire de Cevital depuis 2007. Notre étude a quant à elle porté sur l'optimisation du procédé en question en utilisant un plan de surface de réponse.

Nous présenterons dans la première partie de ce mémoire une synthèse bibliographique des connaissances sur l'huile de soja ainsi que les deux principales méthodes de raffinage utilisées. Par la suite, nous nous intéresserons plus en détails au dégommeage enzymatique ainsi qu'à l'enzyme utilisée, à savoir la Lecitase[®] Ultra. Nous expliquerons son mécanisme d'action et

tiendrons à définir plusieurs de ses propriétés sur lesquelles s'appuient nos choix des différents paramètres que nous désirons optimiser.

Enfin, la deuxième partie, sera consacrée à la conduite expérimentale et l'élaboration du plan d'expériences qui permettra d'aboutir aux valeurs des paramètres assurant un dégommage optimal.

Partie

Bibliographique

Chapitre I

L'huile de soja

I-1- Définition

Le soja constitue la principale graine oléagineuse produite dans le monde, en raison de ses caractéristiques agronomiques, ses protéines de haute qualité ainsi que pour la valeur de son huile comestible (GUNSTONE et WANG, 2002). Cette plante, de son nom latin *Glycine max* L., est originaire d'Asie, elle est intensivement cultivée dans d'autres régions à climat chaud et humide, notamment l'Amérique du Nord et du Sud.

L'huile brute de soja est généralement obtenue par extraction par solvant à partir des graines qui renferment de 17 à 20% d'huile qui ne peut être consommée telle quelle. En effet, cette huile renferme des composés indésirables qui devront être éliminés au cours d'un procédé de raffinage (RANKEN, KILL et BAKER, 1997).

I-2- Composition

L'huile de soja obtenue après extraction est appelée huile brute, elle renferme différents types de lipides qui consistent principalement en des lipides neutres qui incluent les tri-, di- et monoglycérides, des acides gras libres, ainsi que les lipides polaires. Elle contient également une faible teneur en composés insaponifiables qui comportent les tocophérols, phytostérols et des hydrocarbures tel que le squalène.

On retrouve également dans l'huile de soja, des traces de métaux à de très faibles concentrations (ppm) (GUNSTONE et WANG, 2002).

Le raffinage permet de réduire voire d'éliminer ces composés mineurs et indésirables. La composition typique de l'huile de soja brute et raffinée est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1. Composition moyenne de l'huile de soja brute et raffinée (PRYDE, 1980).

Composant	Huile brute	Huile raffinée
Triglycérides (%)	95 - 97	> 99
Phosphatides (%)	1.5 - 2.5	0.003-0.045
Acides gras libres (%)	0.3 - 0.7	< 0.05
Substances insaponifiables(%)	1.6	0.3
Stérols (%)	0.33	0.13
Tocophérols (%)	0.15 - 0.21	0.11 - 0.18
Hydrocarbures (%)	0.014	0.01
Traces de métaux		
Fer (ppm)	1 - 3	0.1 - 0.3
Cuivre (ppm)	0.03 - 0.05	0.02 - 0.06

I-3- Les différents types de phospholipides

Les phospholipides constituent la majeure partie des lipides polaires de l'huile de soja. Ils sont répartis en trois principales classes : phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) et le phosphatidylinositol (PI) à des proportions respectivement de 35%, 25% et 15%. On retrouve également 5 à 10% d'acide phosphatidique (AP) et le reste est formé de composés phospholipidiques mineurs. La figure 1 illustre les structures moléculaires et la formation, par réaction d'estérification, des quatre principaux types de phospholipides retrouvés dans le soja. (WANG *et al.*, 1997; LIU, 1997).

Ces phospholipides présentent une hydratabilité différente les uns des autres, il a également été mis en évidence par HVOLBY (1971) que la majeure partie des phospholipides non hydratables était constituée de sels de calcium et de magnésium de l'acide phosphatidique (SLEETER, 1981).

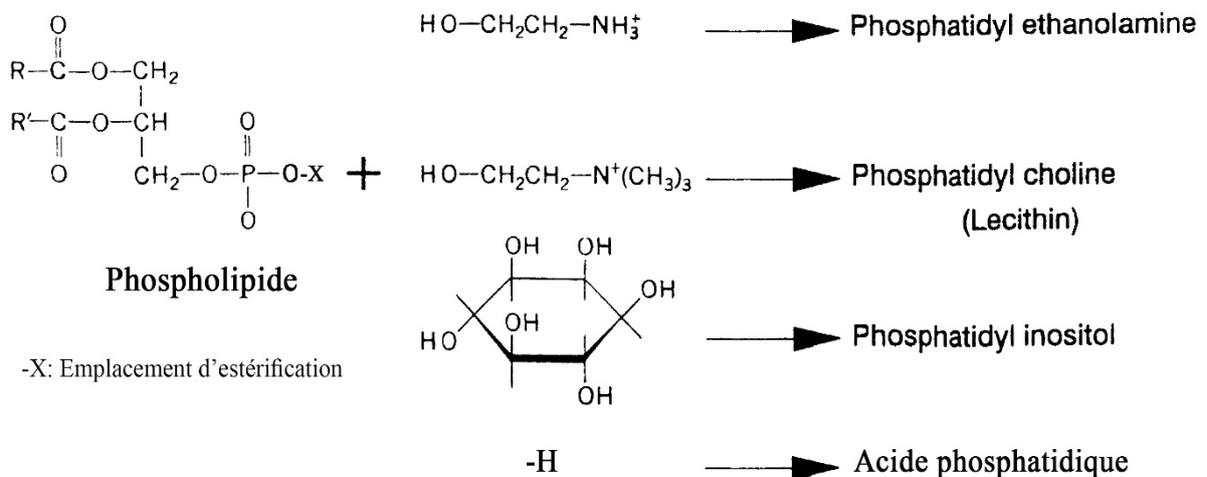


Figure 1. Structure moléculaire et formation des phospholipides communément retrouvés dans le soja (WANG *et al.*, 1997).

Chapitre II

Raffinage des huiles végétales

II-1- Définition du raffinage des huiles végétales

Le raffinage des huiles végétales est une technologie récente, il a longtemps été considéré comme étant une neutralisation alcaline de l'acidité des huiles. Cependant, au fil du temps, cette définition s'est élargie à tous les procédés de traitement post-extraction des huiles, effectués dans des installations dites, raffineries (LUSAS et *al*, 2012).

En effet, les huiles extraites sont rarement utilisables à l'état brut (tel que l'huile de soja), exception faite pour les huiles de pression à froid : huile d'olive et l'huile de noix (FAUR, 1988).

Le procédé de raffinage met donc en œuvre une série d'étapes de transformation physique ou chimique destinées à garantir au consommateur un produit d'aspect engageant, neutre de goût, résistant à l'oxydation, adapté à l'emploi désiré et débarrassé de ses substances toxiques ou nocives (KARLESKIND et DENISE, 1992).

II-2- But du raffinage

Le procédé de raffinage, après extraction par solvant, consiste en une purification complète de l'huile brute des composés qui ont une influence négative sur sa qualité, stabilité et conservation. Il permet en outre d'assurer un haut et constant niveau de qualité ainsi que de préparer une huile qui puisse se prêter à des traitements de modification tels que: l'hydrogénation ou l'interesterification, et cela en éliminant certains catalyseurs parasites de ces réactions (MATTHÄUS, 2012).

Dans le même temps, il est important de conserver dans l'huile raffinée les composés mineurs qui présentent un effet bénéfique pour l'huile et notamment certains composés de l'insaponifiable tels que les tocophérols et les phytostérols (PAGÈS-XATART-PARÈS, 2008).

L'huile brute de soja contient des impuretés solubles et insolubles, nous détaillons dans le tableau 2, la nature de ces composés indésirables, leur origine ainsi que les inconvénients de leur présence.

Tableau 2. Constituants mineurs et contaminants de l'huile de soja à éliminer au cours du raffinage (KARLESKIND et DENISE, 1992 ; PROCTOR, 1997; PAGÈS-XATART-PARÈS, 2008).

Nature des constituants	Origine	Inconvénients de leur présence
<i>Impuretés insolubles dans l'huile</i>		
Fragments de graines	- Procédés d'extraction de l'huile brute.	- Formation d'un trouble. - Passage d'enzymes initialement présentent à la surface des graines et donc hydrolyse enzymatique de l'huile.
Fraction cireuse	- Constituant naturel, en très faible proportion.	- Formation d'un trouble.
Eau	- Constituant naturel - Résiduelle du procédé d'extraction.	- Catalyseur des réactions d'hydrolyse enzymatique. La teneur en eau doit être inférieure à 0.2%.
Insecticides	- Traitements de surface des graines - Traitements au cours du stockage des graines	- Risques sur la santé du consommateur au cas où des résidus persisteraient, cela est peu probable si le raffinage est effectué correctement.
<i>Impuretés solubles dans l'huile</i>		
Phosphatides	- Constituants naturels entre 2 à 5% de l'huile	- Aspect trouble - Instabilité organoleptique - Dépôt et brunissement à chaud - Propriétés tensio-actives et émulsifiantes gênant les opérations du raffinage
Acides gras libres	- Produits de dégradation. - Libérés par hydrolyse enzymatique, présents à hauteur de 0,3 à 0.7%	- Catalyseur d'oxydation - Catalyseur d'hydrolyse productrice de glycérides partiels et autre AGL - Instabilité organoleptique et saveur indésirable - Fumée à chaud
Colorants	- Constituants naturels - D'origine oxydative	- Couleur - Instabilité organoleptique - Ceux d'origine oxydative sont très peu retenus lors de la décoloration
Hydrocarbures Métaux lourds Mycotoxines (aflatoxine)	- Contamination	- Risques sur la santé
Aldéhydes et cétones	- Constituants naturels - Auto-oxydation	- Goût et odeur
Métaux (cuivre, fer,...)	- Liés à des composés organiques de l'huile, présents à l'état de traces	- Catalyseurs d'oxydation

II-3- Les différents procédés de raffinage de l'huile de soja

Le raffinage de l'huile brute de soja peut être effectué en suivant l'un des deux principaux procédés de raffinage à savoir physique ou chimique. Le choix de la méthode à adopter est en fonction du type d'huile à traiter, de sa qualité et de l'objectif visé. Ces deux méthodes diffèrent l'une de l'autre du point de vue du type et performance de l'étape de neutralisation. Dans le cas du raffinage physique, l'huile est débarrassée des AGL par de la vapeur d'eau chaude, on parlera dans ce cas de distillation neutralisante. Le procédé de raffinage chimique, met en œuvre, quant à lui, des solutions alcalines pour les neutraliser (MATTHÄUS, 2012).

Une autre méthode de traitement des huiles brutes de soja, utilisant des enzymes et dérivée du procédé physique, a vu le jour et présente plusieurs avantages que nous décrirons plus loin (Cf. II-3-2).

Les opérations essentielles du raffinage sont les suivantes :

- Démucilagination
- Neutralisation
- Décoloration
- Désodorisation

II-3-1- Procédé de raffinage chimique

II-3-1-1- Dégommage

Le dégomme ou déémucilagination des huiles végétales est la première étape du raffinage, elle consiste en une réduction du contenu de l'huile en phospholipides. Le but étant d'amener la teneur en phosphore à un niveau très bas (MATTHÄUS, 2012). LIST et *al.* (1978), ont estimé que le dégomme d'une huile de soja réduit sa teneur en phosphore de 70 à 98% en abaissant cette dernière de 500-900 ppm contenue dans l'huile brute à 12-170 ppm dans l'huile déémucilaginée. Par ailleurs, le terme lécmithine est souvent employé pour décmrire d'une manière générale, le mélange de phospholipides extrait au cours de cette étape et qui est constitué de: phosphatidylcholine, phosphatidylinositol, et phosphatidylethanolamine.

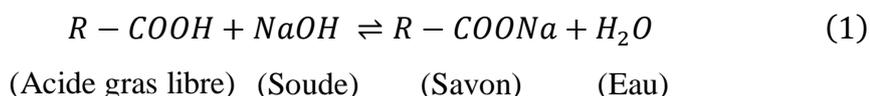
La déémucilagination dans le procédé de raffinage chimique est également appelée conditionnement des mucilages, elle permet une meilleure précipitation lors du traitement à la soude effectué au cours de la neutralisation. L'huile est chauffée à une température de 60 à 80°C, il s'en suit un ajout d'acide phosphorique à 75% par une pompe doseuse. L'huile et l'acide passent alors dans un mélangeur rapide, puis dans un mélangeur lent à axe vertical

assurant un temps de contact de 15 à 20 minutes. Le mélange est ensuite envoyé à l'étage de neutralisation (KARLESKIND et DENISE, 1992).

L'utilisation d'acide phosphorique permet d'éliminer le calcium et le magnésium contenus dans les sels de phospholipides (non hydratables) et qui réduisent leur solubilité en permettant de les transformer en phospholipides hydratables (HVOLBY, 1971). L'acide phosphorique peut également être remplacé par d'autres acides, tel que l'acide citrique, moins corrosif pour les installations et autorisé en usage alimentaire.

II-3-1-2- Neutralisation

Le principe de cette étape repose sur la transformation des acides gras libres en sels de sodium ou de potasse, c'est-à-dire en savon, lesquels sont très peu solubles dans l'huile mais solubles dans l'eau (FRANÇOIS, 1974). La réaction de neutralisation est de la forme :



On remarque à partir de cette équation que la réaction de neutralisation est incomplète, par conséquent pour la déplacer dans le sens d'une neutralisation complète et pouvoir éliminer les AGL jusqu'à un niveau souhaitable pour le reste du procédé de raffinage, il est nécessaire d'opérer avec un excès de soude tout en tenant compte des éventuelles réactions de saponification parasite pouvant attaquer les glycérides de l'huile, formant ainsi du glycérol et des savons.

L'huile en sortie de l'étage de dégomme est chauffée à une température avoisinant les 90°C, il s'en suit une injection de la solution neutralisante (NaOH ou KOH). Le mélange d'huile et de soude passe dans un mélangeur rapide avant d'être envoyé vers la centrifugeuse destinée à séparer les pâtes de neutralisation (KARLESKIND et DENISE, 1992).

Outre la neutralisation des acides gras libres contenus dans l'huile, ce traitement à la soude élimine certains résidus indésirables (certains composés phytosanitaires, des traces de composés protidiques, de métaux) et réduit la couleur de l'huile par destruction partielle des pigments (PAGÈS-XATART-PARÈS, 2008).

II-3-1-3- Lavage et séchage

L'opération de lavage se résume à l'ajout de 10 à 20% d'eau à une température de 85°C puis centrifugation. Il est souvent recommandé de procéder à deux lavages successifs et d'utiliser une eau adoucie qui évite l'encrassement des bols des centrifugeuses. (PLATON, 2008).

Le séchage est quant à lui effectué dans un sécheur sous pression et permet d'éliminer l'eau contenue dans l'huile et de l'amener à un niveau d'humidité résiduelle comprise entre 0.05% et 0.1%. Cela permet d'éviter le colmatage des filtres de décoloration et d'améliorer le pouvoir adsorbant des terres décolorantes (PROCTOR, 1997).

II-3-1-4- Décoloration

Cette opération vise à réduire les pigments colorés que la neutralisation n'a que très partiellement détruits. Elle élimine également les savons et les phospholipides résiduels, les produits d'oxydation, les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ainsi que les traces métalliques. Elle fait intervenir un phénomène physique : l'adsorption sur des terres décolorantes, du charbon actif, des silices spéciales ou des combinaisons de ces substances (KARLESKIND et DENISE, 1992; PLATON, 2008; MATTHÄUS, 2012; LUSAS et *al*, 2012).

La décoloration des huiles végétales fluides donne de meilleurs résultats lorsque l'opération est conduite à des températures comprises entre 80 et 120°C pour des temps de contact de 15 à 30 minutes. Une agitation efficace favorise le contact et permet de limiter le temps de réaction. L'opération s'effectue toujours sous vide léger de façon à empêcher l'oxydation qui est favorisée par la dispersion de l'huile sur les particules d'adsorbant. La quantité d'adsorbant à employer dépend à la fois de l'objectif poursuivi et de la nature de l'huile à traiter, de 0.6 à 0.9 % pour l'huile de soja (KARTIKA, 2005). WIEDERMANN (1981), recommande par ailleurs, d'optimiser ce dosage non pas en fonction des pigments, qui seront éliminés au cours de l'opération de la désodorisation, mais en fonction des produits d'oxydation primaires et secondaires de l'huile décolorée. Ce résultat peut être atteint en veillant à obtenir un indice de peroxyde de l'huile décolorée réduit à zéro (WIEDERMANN, 1981).

Une fois l'huile décolorée, il est impératif de procéder à la séparation des terres décolorantes par une filtration efficace. En effet, les terres résiduelles risquent d'en favoriser l'oxydation et d'encrasser les équipements en aval (ERICKSSON, 1989). Cette opération, dans

le cas du procédé en continu, est conduite au niveau de filtres mettant en œuvre des parois poreuses, les plus communs sont les filtres Niagara formés d'une série d'éléments filtrants verticaux. Cependant, ce type de filtre risque continuellement de laisser passer des traces de terre et doit être doublé par un ou deux filtres de sécurité (KARLESKIND et DENISE, 1992).

II-3-1-5- Désodorisation

Dernière étape du raffinage, la désodorisation a pour objectif d'éliminer tous les composés ayant une influence négative sur le goût et l'odeur de l'huile. Les produits responsables de ces odeurs sont en général des substances volatiles diverses (aldéhydes, cétones, ...etc.), elles peuvent provenir des graines de soja ou encore des produits de dégradation formés au cours du stockage ou du traitement de l'huile tels que la décoloration et l'hydrogénation. Le but de la désodorisation est donc de produire une huile plate de goût et d'odeur, présentant une couleur jaune pâle, libérée des produits d'oxydation (valeur de peroxyde égale à 0) et présentant une teneur en acides gras libres inférieure à 0.03% (FRANÇOIS, 1974 ; WOERFEL, 1990 ; MATTHÄUS, 2012).

La désodorisation met en œuvre une série d'opération (ERICKSSON, 1989 ; PROCTOR, 1997 ; KARTIKA, 2005):

- La désaération destinée à éliminer l'oxygène dissout dans l'huile, par chauffage à pression réduite.
- Le préchauffage, par échange thermique avec l'huile chaude désodorisée.
- La désodorisation qui consiste à injecter de la vapeur sèche dans l'huile de soja maintenue sous vide (1-6 mm Hg) à des températures de l'ordre de 225°C, avec une plage maximale de 245°-250°C, pendant un temps relativement long (1h30 à 3 h) en fonction des équipements utilisés.
- Le refroidissement de l'huile désodorisée.

D'autres composés sont également entraînés avec les substances odorantes, tels que les acides gras libres, les stérols, les tocophérols, les hydrocarbures saturés et insaturés. Le traitement permet aussi l'élimination de composés indésirables ou contaminants du type HAP légers, résidus de pesticides légers ainsi que les produits d'oxydation (PETRAUSKAITE, 2000).

II-3-2- Procédé de raffinage enzymatique

Le dégomme enzymatique des huiles végétales, y compris l'huile de soja, est la méthode la plus récente en la matière. Elle constitue une technique adéquate pour le raffinage physique qui requiert de faibles teneurs en phosphore qui ne peuvent être atteintes avec les méthodes conventionnelles de démulagination (traitement à l'acide, dégomme à l'eau, super-dégomme, etc.). Cette technique a initialement été développée par la compagnie allemande Lurgi GmbH, elle est également connue sous le nom de procédé Enzymax® (AALRUST et *al.*, 1992).

Le but de ce procédé est de convertir grâce à une phospholipase, les phospholipides non hydratés en une forme hydratée avec pour avantages un accroissement du rendement en huile, des coûts de fabrication réduits ainsi que la diminution des effluents (KLAUS, 1998).

Le procédé Enzymax peut être subdivisé en quatre principales étapes (YANG et *al.*, 2006):

1. Ajustement des conditions optimales de réaction de l'enzyme, pH et température.
2. Addition de la solution enzymatique.
3. Déroulement de la réaction enzymatique.
4. Séparation des phospholipides hydratés de l'huile.

Les huiles obtenues à la suite de ce procédé de dégomme poursuivent un raffinage physique. Elles sont ainsi envoyées directement à la section de décoloration sans passer par l'étape de neutralisation. En effet, l'élimination des AGL dans ce cas se fera par distillation sous vide au cours de la désodorisation.

II-4- Étude comparative des deux types de raffinage

II-4-1- Comparaison

Les principales différences existantes entre les deux procédés sont présentées ci-dessous:

Tableau 3. Caractérisation des deux types de raffinages (KARLESKIND et DENISE, 1992 ; MÜNCH, 2004).

	Raffinage chimique	Raffinage enzymatique
Démucilagination	- Élimination des mucilages par des solutions acides (acide phosphorique ou citrique).	- Démucilagination par une enzyme « Lecitase® Ultra »
Neutralisation	- A la soude caustique de concentration élevée (45%). - Transformation des acides gras libres en savons appelés communément : pâtes de neutralisation ou soapstocks.	- Ajout de la soude caustique NaOH (14%) pour ajuster et atteindre le pH nécessaire à l'activité de l'enzyme. - Absence de pâtes de neutralisation.
Séparation	- L'huile brute est séparée des savons et des autres impuretés.	- L'huile brute est séparée des mucilages tandis que l'enzyme est dénaturée à 80°C.
Lavage	- Avec de l'eau purifiée pour éliminer les substances alcalines (savon et soude en excès), ainsi que les dernières traces de métaux, de phospholipides et autres impuretés.	- Pas de lavage.

II-4-2- Détermination des avantages et inconvénients

Les avantages et les inconvénients liés au raffinage chimique et enzymatique sont détaillés dans le tableau ci-dessous:

Tableau 4. Avantages et inconvénients du raffinage chimique et enzymatique (KARLESKIND et DENISE, 1992 ; NOVOZYMES 2002).

Avantages	Inconvénients
<i>Raffinage chimique</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Permet de raffiner les huiles même si elles ont subi un début de dégradation. - Effet décolorant de la neutralisation à la soude, ce qui facilite les étapes de décoloration et de désodorisation. -Consommation moindre de terre décolorante. - Récupération de l'huile acide à partir du distillat. 	<ul style="list-style-type: none"> - Produit d'importants volumes de pâtes de neutralisation. - Provoque des pertes importantes par entraînement d'huile neutre dans les soapstocks. - Une quantité de soude caustique excessive peut causer une saponification et des pertes d'huile supplémentaires. - Le procédé chimique utilise d'importantes quantités de produits chimiques agressifs, qui peuvent avoir un impact négatif sur l'environnement. - La rétention d'huile dans la terre usée est comprise entre 23-30 %. - Les eaux de lavage entraînent une quantité notable d'huile neutre.
<i>Raffinage enzymatique</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Le dégomme enzymatique ne génère pas de pâte de neutralisation et permet ainsi d'éviter les pertes d'huiles liées à la séparation - Bonne stabilité de l'huile finie: teneur quasiment nulle en phosphore - Les raffineurs réalisent des économies d'énergie, d'eau et d'équipements - Enzyme biodégradable qui est désactivée durant le procédé. -Consommation moindre de produits chimiques (Acide phosphorique et soude). - Diminution de la quantité des eaux usées. - Génère des coproduits dont la valeur potentielle est intéressante: les lysolécithines employées comme émulsifiants par l'industrie alimentaire. 	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle et ajustement du pH et de la température. - Couleur instable, avec des huiles brutes de mauvaise qualité. - Problèmes liés à dénaturation des enzymes. -Plus grande consommation de terre décolorante. - Dégommage efficace et peu coûteux, mais pas avec tous les types d'huiles.

Chapitre III

Dégommage enzymatique

III-1- Caractérisation de l'enzyme utilisée : Lecitase® Ultra

III-1-1- Définition

La Lecitase® Ultra est une phospholipase microbienne d'un poids moléculaire de 35 KD qui a été développée par Novozymes. Elle résulte de la combinaison des gènes homologues des enzymes codant pour l'activité lipasique de *Thermomyces lanuginosus* et de l'activité phospholipasique de *Fusarium oxysporum*, permettant ainsi de conserver la stabilité de *T. lanuginosus* et l'activité phospholipasique de *F. oxysporum*. Les dites modifications génétiques sont introduites dans le génome d'*Aspergillus oryzae*. L'enzyme est par la suite obtenue par fermentation submergée (YANG et al., 2006 ; MISHRA et al., 2009 ; DIJKSTRA^(b), 2013).

Cette enzyme, EC 3.1.1.32, fait partie du groupe des estérases carboxyliques. Elle présente une affinité envers les phospholipides (PL) ainsi que les triglycérides (TAG) (NOVOZYMES, 2002).

III-1-2- Paramètres catalytiques

La Lecitase® Ultra, comme toute enzyme, joue le rôle de biocatalyseur en facilitant une réaction biochimique sans en modifier les produits. Néanmoins, afin d'assurer son bon fonctionnement certains paramètres doivent être consciencieusement définis et contrôlés. Dans le cas du dégomme enzymatique par cette phospholipase A1 (PLA₁), le pH ainsi que la température du milieu réactionnel sont deux paramètres primordiaux.

III-1-2-1- Influence du pH

(a) Influence du pH sur la stabilité de l'enzyme

Les résultats de l'étude de l'influence du pH sur la stabilité de l'enzyme sont présentés au niveau de la figure 2. La Lecitase® Ultra a démontré une bonne stabilité dans un intervalle de pH allant de 4.7 à 7.4, ce qui correspond aux recommandations du fabricant. Il a également été observé une dénaturation irréversible aux pH extrêmes.

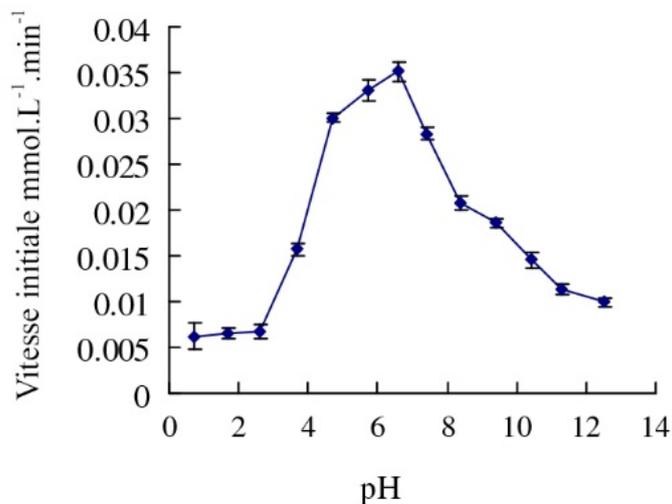
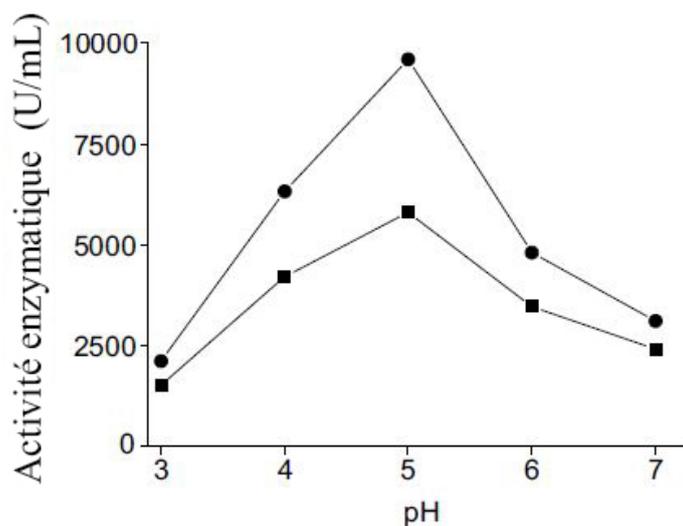


Figure 2. Influence du pH sur la stabilité de la Lecitase® Ultra (WANG *et al.*, 2010).

(b) Influence du pH sur l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est exprimée en unité lipase (U) qui correspond à la quantité d'enzyme qui libère 1 μmol d'acide gras libre titrable par minute.

La figure 3 illustre l'activité lipasique et phospholipasique de la Lecitase® Ultra mesurée à une température de 40°C et en utilisant un tampon citrate. On observe que l'enzyme présente une activité importante dans un environnement acide avec une valeur optimale à pH=5.



■ Activité phospholipasique ; ● Activité lipasique

Figure 3. Influence du pH sur l'activité enzymatique de la Lecitase® Ultra (YANG *et al.*, 2006).

III-1-2-2- Influence de la température

(a) Influence de la température sur la stabilité de l'enzyme

La température est un facteur déterminant, WANG et *al* (2006) ont évalué la stabilité de la Lecitase® Ultra à différentes températures en évaluant les variations de vitesses initiales de l'hydrolyse partielle de l'huile de soja et cela à un pH de 6.8, correspondant au pH optimal de la stabilité de cette enzyme.

Il a été observé, comme cela est exposé sur la figure 4, que la PLA1 (Lecitase® Ultra) présentait une bonne stabilité à des températures inférieures à 45°C. Cependant, à des températures excédant les 60°C, la stabilité de cette enzyme tend à décroître jusqu'à devenir nul pour de températures élevées (>80°C), ceci correspondant à la dénaturation irréversible de la PLA1.

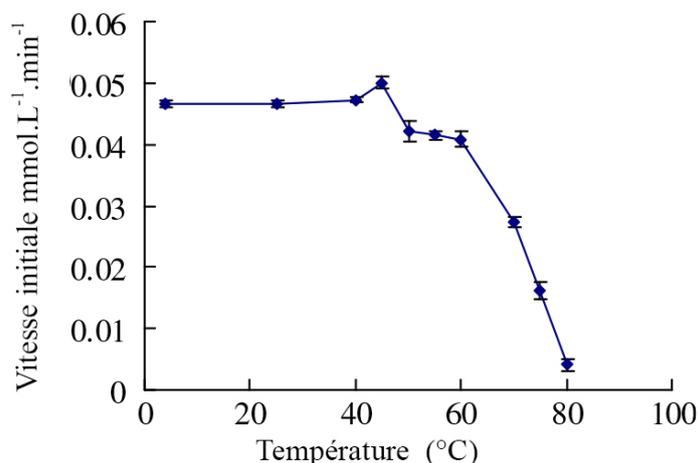
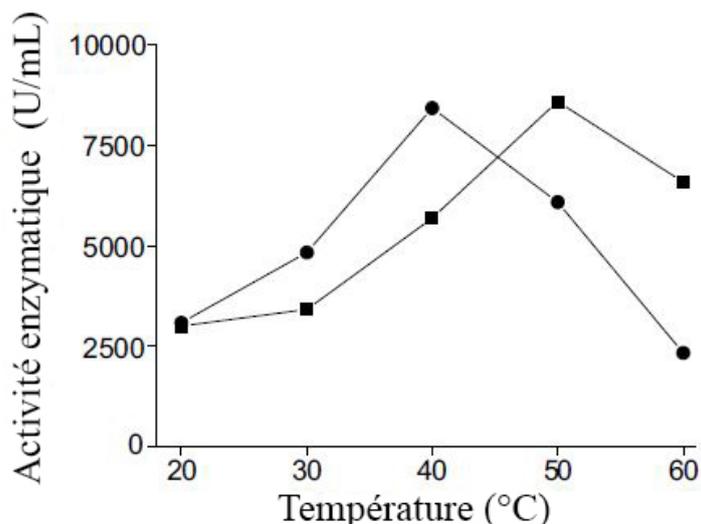


Figure 4. Influence de la température sur la stabilité de la Lecitase® Ultra (WANG et *al.*, 2010).

(b) Influence de la température sur l'activité enzymatique

L'activité de l'enzyme est dépendante de la température tel que démontrée par la figure 5. L'effet de la température apparaît comme étant différent sur l'activité lipasique et phospholipasique. Ainsi, lorsque la température est inférieure à 40°C, l'activité lipasique est plus importante que l'activité phospholipasique. A des températures supérieures de 40°C, l'activité phospholipasique prédomine tandis que l'activité lipasique est minime.



■ Activité phospholipasique ; ● Activité lipasique

Figure 5. Influence de la température sur l'activité enzymatique de la Lecitase® Ultra (YANG et al., 2006).

III-1-3- Mécanisme d'action

La Lecitase® Ultra, étant une PLA₁, elle hydrolyse le groupement acyle des phospholipides en position sn-1, libérant ainsi un acide gras libre, et produisant un 2-acyl-1-lysophospholipide (Figure 6) (RICHMOND et SMITH, 2011 ; YU, MA et al., 2013).

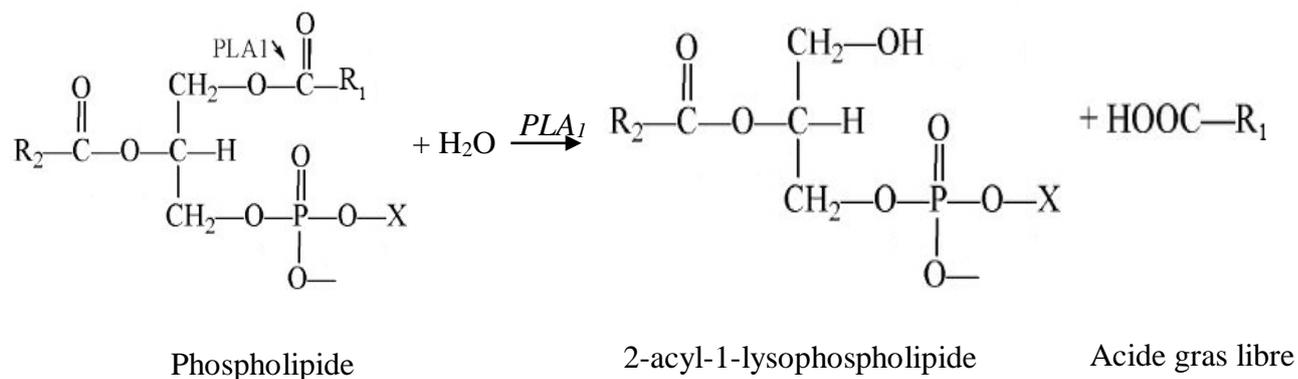
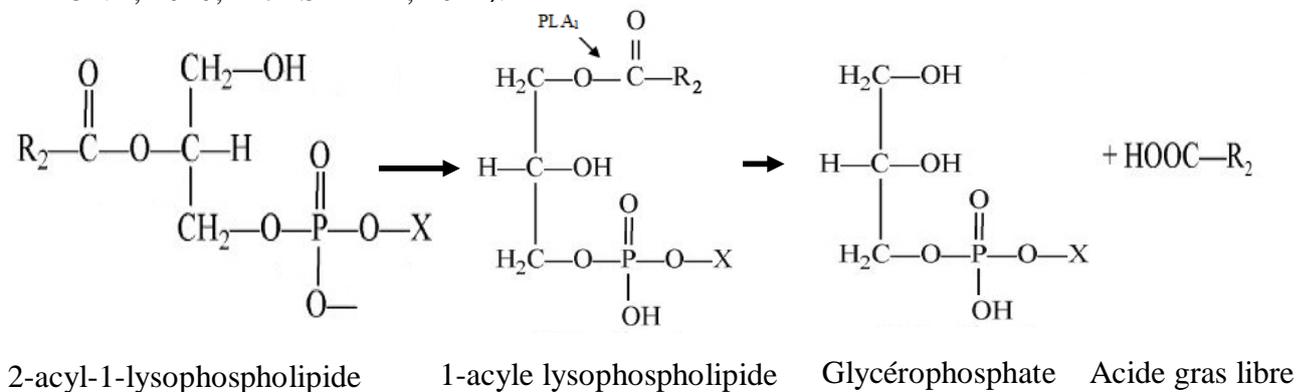


Figure 6. Mode d'action de la Lecitase® Ultra (PLA₁)

Cependant, pour des raisons stéréochimiques, les acides gras des glycérides partiels ont une préférence à se lier en position sn-1 et sn-3. Ainsi, les 2-acyl-1-lysophospholipides, formés par l'action de la PLA₁, seront isomérisés en la forme 1-acyle lysophospholipide semblable structurellement mais beaucoup plus stable, tel que présentée sur la figure 7. Ces composés

présentant un acide gras sur la position sn-1 seront à nouveau sujets à une hydrolyse par la PLA₁ aboutissant à la formation de glycérophosphates retrouvés dans la phase aqueuse de l'huile traitée par la Lecitase[®] Ultra (B. YANG, ZHOU, YANG, WANG ET WANG, 2008; SADEGHI ET MONA, 2010; DIJKSTRA^(a), 2011).



(R_n: Chaîne d'acide gras ; X : H, Choline, ethanolamine, etc.)

Figure 7. Isomérisation du 2-acyl-1-lysophospholipide en 1-acyl-1-lysophospholipide et action de la PLA₁ pour la production d'un glycérophospholipide.

III-2- Cinétique du dégomme enzymatique utilisant la Lecitase[®] Ultra

Au cours du dégomme enzymatique, la Lecitase[®] Ultra n'agit pas directement sur les phospholipides non hydratés (PNH) présents dans l'huile. Ainsi, afin d'obtenir une teneur résiduelle en phosphore minimale répondant aux normes en vigueur, il est indispensable de procéder à un prétraitement à l'acide citrique finement dispersé dans l'huile et cela dans le but de convertir les PNH en une forme plus hydratée (phospholipides hydratés) qui peuvent ainsi migrer dans la phase aqueuse à l'interface huile-eau et être accessibles à l'enzyme (DIJKSTRA, 2011). L'action de l'acide citrique se résume à :

- Une chélation des métaux liés au groupement phosphorique des PL.
- Un changement de pH qui induit une modification des charges électriques des PL.
- Un assouplissement de la micelle permettant à l'enzyme d'y pénétrer.

L'enzyme, étant dans la phase aqueuse maintenue en émulsion dans la phase huileuse, elle agit à l'interface eau-huile sur les phospholipides (MÜNCH, 2004; DIJKSTRA^(b), 2013). Le

mécanisme d'action de l'enzyme est détaillé (Cf. III-1-3). Les lysophospholipides, produits de la dégradation des PL par la PLA₁, sont alors rendus hydrophiles et peuvent être séparés avec l'eau tandis que les acides gras libérés restent dans l'huile. Il est à noter également qu'au début de la réaction, les lysophospholipides formés agissent tels de puissants détergents (pouvoir tensio-actif) qui accélèrent le processus en réduisant les huiles en fines gouttelettes. On obtient ainsi à la fin du dégommage, des gommages peu visqueuses, de couleur jaune pâle, composées à hauteur de 54.3% de lysophospholipides et 45.7% de glycérophospholipides très hydrophiles qui permettent d'assurer une séparation aisée des gommages de la phase huileuse et de faibles pertes en huile (B. YANG et *al.*, 2008; GALHARDO et DAYTON, 2012).

Partie

expérimentale

Chapitre IV

Matériels et méthodes

-IV-1- Caractéristiques de l'huile brute utilisée

Pour la réalisation de cette étude, notre choix s'est porté sur une huile brute de soja. En effet, cette dernière présente une teneur importante en phospholipides (78 ppm) et de surcroûts solubles pour la plupart d'entre eux dans l'huile, ceci nous permettra de mieux illustrer le processus du dégomme enzymatique.

Par conséquent, pour l'optimisation de ce procédé, nous utiliserons une huile brute de soja importée par Cevital et dont les caractéristiques sont détaillées dans le bulletin d'analyses (Annexe. 4).

-IV-2- Caractéristiques de l'enzyme utilisée

La Lecitase® Ultra produite par Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark, est commercialisée sous forme d'une solution aqueuse contenant approximativement 6,5% de protéines. Elle possède une activité de 10 000 U/g (Novozymes, 2007). Cette enzyme est conditionnée dans des bidons opaques en PEHD d'une capacité de 20L et requiert un stockage à une température comprise entre 0 et 10°C. (Annexe. 5)

-IV-3- Echantillonnage de l'huile brute

La quantité d'huile brute de soja nécessaire au déroulement des expériences a été prélevée à partir d'un bac de stockage. L'huile est ensuite conservée tout au long des essais à l'abri de la lumière, à température ambiante, dans des bouteilles en PET d'une capacité de 5 L.

-IV-4- Dégomme enzymatique à échelle laboratoire

-IV-4-1- Calcul des quantités des réactifs

Nous présentons ci-dessous, les différentes méthodes appliquées aux calculs des quantités des réactifs utilisés. Les quantités déterminées pour la soude caustique et l'enzyme ne sont présentées qu'à titre illustratif et seront sujettes à modification au cours de notre étude (Cf. IV-6)

➤ Calcul de la quantité d'acide citrique

La quantité d'acide citrique ajoutée est proportionnelle à la teneur en PNH. A cet effet, une optimisation de ce dosage a été effectuée par NOVOZYMES et Cevital pour l'huile de soja, et une quantité de 650 ppm d'acide citrique monohydraté est recommandée.

On obtient donc pour 200 g d'huile, une quantité de 0,00013 g d'acide citrique monohydraté, correspondant pour une solution à 50%, à un volume de 0,212 mL.

➤ **Calcul de la quantité de soude**

La soude caustique à 14% est utilisée pour neutraliser partiellement l'acide citrique et permettre de rehausser le pH jusqu'à atteindre une valeur favorable à l'activité de la Lecitase® Ultra. La quantité de soude à ajouter (recommandé par NOVOZYMES) est de 186 ppm ce qui équivaut pour 200 g d'huile à 0,231 mL.

➤ **Calcul de la quantité d'enzymes**

Une quantité de solution enzymatique, nécessaire pour la réalisation des différents essais, est prélevée à partir du contenant disposé au niveau de la ligne de fabrication. La solution enzymatique est conditionnée dans un flacon en verre de 250 ml, fermé hermétiquement et conservé au réfrigérateur à une température de 5°C.

Le calcul des volumes d'enzymes à utiliser est effectué comme suit : Pour la quantité d'enzymes recommandée par NOVOZYMES, à savoir 30 ppm, les calculs suivant sont effectués :

On détermine d'une part la quantité d'enzymes nécessaire pour 200g d'huile brute à traiter:

$$\begin{aligned} 30 \text{ g d'enzymes} &\longrightarrow 1 \text{ T huile} \\ x \text{ g} &\longrightarrow 2 \cdot 10^{-4} \text{ T d'huile} \end{aligned}$$

On trouve : $x = 0,006 \text{ g}$.

D'autre part, l'enzyme n'est pas ajoutée telle quelle à l'état pur mais sous forme d'une solution diluée à 10 % dont on calcule le volume :

$$T = \frac{V_i}{V_f} \implies V_f = \frac{\frac{m}{d} \times 1000}{T}$$

Où : V_i : volume d'enzymes initial ;

$V_f = V_{enzyme}$: volume d'enzymes en μL ;

m : masse d'enzymes en g ;

d : densité de la solution enzymatique, $d = 1,02$;

T : taux de dilution, égale à 10% ;

1000 : facteur de conversion du volume en μL .

On trouve:

$V_{enzyme} = 58,82 \mu\text{L}$

➤ Calcul de la quantité d'eau à ajouter

L'eau distillée est ajoutée à hauteur de 2,5 % de la masse d'huile de soja brute à dégommer, on aura donc : $V_{\text{eau}} = 5 \text{ mL}$.

-IV-4-2- Mode opératoire

Peser 200g d'huile brute de soja dans un ballon et le fixer au mécanisme d'agitation, de sorte à ce que le niveau d'huile soit en totalité immergé dans le bain marie (Figure 8). Démarrer l'agitation à 350 tr/min et la maintenir tout au long de la manipulation. Ensuite, il est procédé au chauffage jusqu'à atteindre une température de $70 \pm 0.1^\circ\text{C}$, puis 0,21 mL d'acide citrique monohydraté à 50% sont ajoutés et laissés pendant 20 minutes afin d'obtenir une bonne homogénéisation et permettre la chélation des métaux (Ca^{2+} , Mg^{2+} , ...).

La température du bain est baissée et maintenue à $50 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (correspondant à la température optimale de l'activité de l'enzyme). La solution de soude caustique à 14% (quantité variable en fonction de l'essai) est ajoutée dans le réacteur avec 3 minutes de temps d'agitation. Par la suite, 5 mL d'eau distillée sont ajoutées (3 minutes). Une analyse du pH est effectuée à ce niveau. A cet effet, 5 mL d'huile sont prélevées (cf. IV-5-3).

Enfin, une quantité d'enzymes diluées à 10% est ajoutée. La catalyse est ainsi initiée et dure pendant un temps près-déterminé.

A la fin de la réaction, l'agitation est stoppée. Le milieu réactionnel est centrifugé à 4000 tr/min pendant 20 min afin de récupérer la phase légère (huile dégommée) dans des tubes (préformes). La teneur du phosphore ainsi que l'acidité des prélèvements sont mesurés.

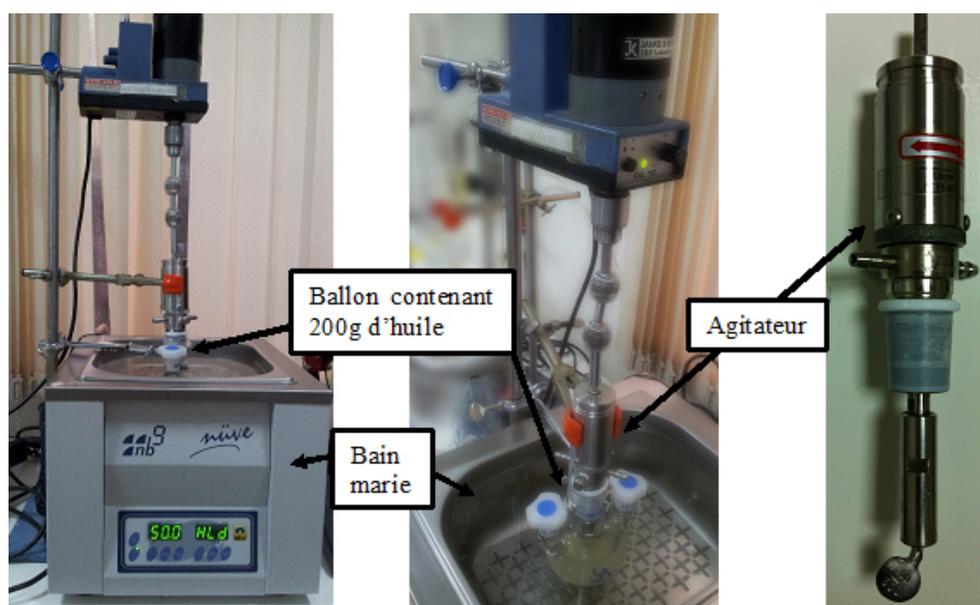


Figure 8. Description de l'installation du dégompage enzymatique à échelle laboratoire.

-IV-5- Paramètres de suivi du dégomme enzymatique

Le bon déroulement du dégomme enzymatique peut être déterminé par le biais de certains critères de qualité qui permettent de savoir, comparé à une norme, si l'enzyme a été active et permis la réduction de la teneur en phosphore de l'huile. A cet effet, la détermination du pH, de la teneur en phosphore et de l'acidité de l'huile de chaque essai est effectuée en suivant des protocoles certifiés.

-IV-5-1- Détermination de l'acidité (ISO 660: 2009)

➤ Définition

L'acidité est le pourcentage en masse d'acides gras libres exprimé conventionnellement en acide oléique pour la majeure partie des corps gras. Elle est déterminée conformément au mode opératoire spécifié par la norme NF EN ISO 660.

➤ Principe

Mise en solution d'un échantillon dans un mélange adapté de solvants, puis titrage des acides présents avec une solution éthanolique ou méthanolique d'hydroxyde de potassium ou de sodium.

➤ Mode opératoire

Préparer dans un Erlenmeyer une solution de 75 mL d'alcool neutralisé (éthanol + quelques gouttes de phénolphtaléine et titrer avec NaOH jusqu'à apparition d'une coloration rose). Ajouter 10g d'huile à analyser et faire dissoudre en chauffant légèrement. Après avoir ajouté quelques gouttes de phénolphtaléine, titrer en agitant constamment à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium. Le point final du titrage est atteint lorsque l'ajout d'une seule goutte d'alcali provoque un changement de couleur net même s'il est léger, persistant durant au moins 15 s.

➤ Expression des résultats

$$\text{Acidité (\%)} = \frac{N \times V \times M}{10 \times P}$$

M : masse molaire d'acide oléique, 282g / mol ;

N : normalité de NaOH à 0,1N ;

P : poids de la prise d'essai, en grammes ;

V : volume de NaOH utilisé pour le titrage, en millilitres.

Donc on aura :

$$\text{Acidité \%} = 0,282 \times V$$

-IV-5-2- Dosage du phosphore (AOCS Official Method Ca 12-55, corrigée 2009)

➤ Définition et principe

Cette méthode permet de déterminer la teneur en phosphore ou en phosphatides équivalent par calcination de l'échantillon en présence d'oxyde de zinc, suivie par la mesure spectrophotométrique du phosphore en tant que complexe bleu d'acide phosphomolybdique.

➤ Mode opératoire

Peser $3,0 \pm 0,001$ g d'huile dans un creuset en platine ou en silice et ajouter 0,5 g d'oxyde de zinc, chauffer progressivement la préparation sur une plaque chauffante puis augmenter la température de chauffage graduellement jusqu'à obtenir une carbonatation complète de l'échantillon afin de permettre l'élimination de toute matière organique après filtration.

Disposer le creuset dans un four à moufle à une température de 550 - 650°C pendant 2 heures, puis laisser refroidir jusqu'à température ambiante. Procéder ensuite à l'ajout de 5 mL d'eau distillée et 5 mL d'HCl concentré aux cendres. Couvrir le creuset d'un verre à montre et porter à ébullition pendant 5 minutes. Filtrer la solution dans une fiole de 100 mL, et rincer les parois du verre à montre avec 5 mL d'eau distillée chaude, le creuset et le filtre sont quant à eux lavés quatre fois avec 5 mL d'eau distillée chaude afin de récupérer les traces minérales restantes sur les parois.

La solution filtrée est refroidie et neutralisée avec une solution de KOH à 50 %, jusqu'à apparition d'un trouble puis ajouter de l'HCl concentré jusqu'à dissolution du précipité d'oxyde de zinc, enfin, ajouter deux gouttes en excès et ajuster avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Pipeter 10 mL de cette solution et les transvaser dans une fiole de 50 mL. 8 mL de sulfate d'hydrazine et 2 mL de molybdate de sodium sont ajoutés respectivement, agiter modérément après avoir fermé le bouchon de la fiole.

Retirer le bouchon de la fiole et procéder à un chauffage pendant $10 \pm 0,5$ min dans un bain marie d'eau bouillante, puis refroidir dans un bain d'eau jusqu'à $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Ajuster jusqu'au trait de jauge et agiter vigoureusement.

La lecture des absorbances est réalisée avec un spectrophotomètre UV-visible à 650 nm.

➤ **Préparation des solutions standards**

• **Solution standard du phosphore (solution mère)**

Dissoudre 1,0967 g de dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 , préalablement séché à 101°C pendant 2 heures, avec 250 mL d'eau distillée dans une fiole jaugée, cette solution contient 1 mg de phosphore par ml.

• **Solution standard de travail**

Pipeter 5 mL de la solution mère, puis les transvaser dans une fiole de 500 mL, et ajuster avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Cette solution contient 0,01mg de phosphore par ml.

➤ **Préparation de la courbe d'étalonnage**

Pour le dosage du phosphore il est nécessaire de tracer une courbe d'étalonnage du phosphore tel que décrit ci-dessous:

- Pipeter 0,0 – 1,0 – 2,0 – 4,0 – 6,0 – 8,0 et 10 mL à partir de la solution standard de travail dans une fiole de 50 mL;
- Chaque échantillon sera dilué avec 10 mL d'eau distillée;
- Addition de 8 mL de sulfate d'hydrazine et 2 mL de la solution de molybdate de sodium.
- L'absorbance de chaque échantillon est déterminée par spectrophotométrie UV-visible à 650 nm, la teneur en phosphore sera respectivement de: 0.0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg.

➤ **Expression des résultats**

$$\% \text{ phosphore} = \frac{10 \cdot (A - B)}{V \cdot W}$$

Où : A : teneur en phosphore de l'échantillon en mg ;

B : teneur en phosphore dans le blanc en mg ;

W : masse de la prise d'essai de l'échantillon en g (3,0-3,2 g)

V : volume de l'échantillon (10 mL de la solution).

-IV-5-3-Détermination du pH par la méthode potentiométrique (NOVOZYMES)

➤ Définition et principe

Le pH de l'huile est la différence de potentiel, à la température de mesure, entre deux électrodes immergées dans la phase aqueuse séparée de l'huile émulsionnée, et exprimé en unité du pH.

➤ Mode opératoire

Verser dans un bécher de 50 mL, les 5 mL d'huile prélevée au cours du dégommeage, auxquels on rajoute 5 mL d'eau distillée chaude. Procéder à une agitation sur une plaque agitatrice-chauffante pendant 5 minutes jusqu'à obtenir une bonne émulsion puis centrifuger à 4000 tr/min pendant 10 minutes.

Après centrifugation, récupérer la phase aqueuse et mesurer le pH à l'aide d'un pH mètre (HANNA Instruments pH211).

➤ Expression des résultats

Les valeurs de pH mesurés sont transformées en pH corrigés afin de compenser l'effet de dilution en utilisant la formule suivante :

$$\text{pH}_{\text{corrigé}} = \text{pH}_{\text{mesuré}} - 0.26$$

-IV-6- Conception expérimentale

-IV-6-1- Introduction aux plans d'expériences

La méthode des plans d'expériences est préconisée afin d'optimiser la démarche de réalisation d'expériences. Elle permet d'une part, de modéliser des phénomènes complexes rencontrés actuellement dans la plupart des procédés de fabrication ou d'expériences en laboratoire; et d'autre part, de comprendre aussi bien les relations liant la réponse avec les facteurs, que les facteurs entre eux. Le but étant d'obtenir un maximum d'informations en un minimum d'expériences ce qui est synonyme de gain de temps et de productivité (TINSSON, 2010).

-IV-6-2- Plan de Box-Behnken pour trois facteurs

Box et Behnken ont proposé en 1960 ce plan qui permet d'établir directement un modèle de second degré. Tous les facteurs ont trois niveaux : inférieur (-1), central (0) et supérieur (+1). Ce plan est facile à mettre en œuvre et possède la propriété de séquentialité. On peut entreprendre l'étude des k premiers facteurs en se réservant la possibilité d'en ajouter de nouveaux sans perdre les résultats des essais déjà effectués.

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est construit sur un cube. On place les points expérimentaux au milieu des arêtes du cube. Cette disposition a pour conséquence de répartir tous les points expérimentaux à égale distance du centre du domaine d'étude, donc sur une sphère. Des points au centre du domaine d'étude sont ajoutés.

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est illustré par la figure 9. Le cube possède 12 arêtes. On a l'habitude d'ajouter des points d'expériences au centre du domaine d'étude, en général trois. Le plan de Box-Behnken pour 3 facteurs possède donc 12 + 3 essais, soit 15 essais. On pourra remarquer qu'avec 4 points au centre au lieu de 3, on obtient un plan qui répond au critère de presque-orthogonalité (GOUPY, 2006).

Pour relier les facteurs à la réponse, une équation polynomiale du second degré est présentée ci-après :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + e$$

Avec : $a_0, a_1, a_2, a_3, a_{12}, a_{13}, a_{23}, a_{11}, a_{22}, a_{33}$: Coefficients de régression ;

x_1, x_2, x_3 : Facteurs étudiés ;

y : Réponse mesurée ;

e : Erreur du modèle.

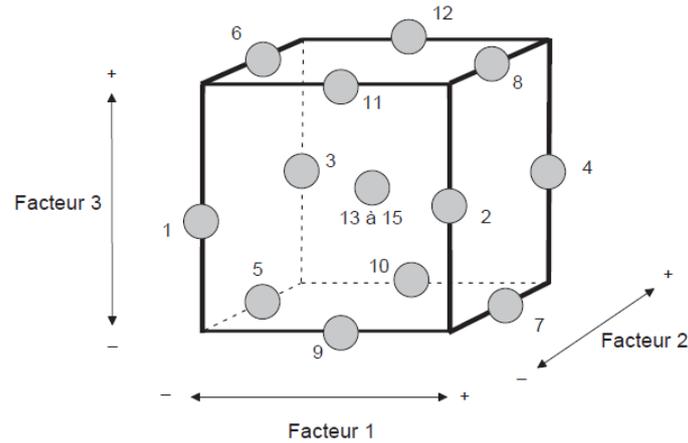


Figure 9. Illustration du plan de box-Behnken pour trois facteurs.

-IV-6-3- Optimisation du dégommage enzymatique : construction du plan BBD à trois facteurs

Nous avons utilisé au cours de cette étude, la méthodologie de surface de réponse pour optimiser le processus du dégommage enzymatique afin d'obtenir une teneur résiduelle minimale en phosphore dans l'huile de soja. Pour cela, nous avons procédé à la réalisation et application d'un plan de Box-Behnken à trois niveaux et trois facteurs, identifiés comme étant les plus influents, à savoir: quantité d'enzymes (X_1), quantité de soude caustique (X_2) et le temps de réaction (X_3) tel que décrit dans le tableau 5.

Par ailleurs, le choix des niveaux bas et haut des différents facteurs a été effectué en se référant aux recommandations de NOVOZYMES et de ce qui est appliqué au niveau industriel chez Cevital.

Tableau 5. Domaine d'étude.

Variables indépendantes	Niveau des facteurs		
	-1	0	1
X_1 : Quantité d'enzymes (ppm)	25	30	35
X_2 : Quantité de NaOH (μ L)	225	250	275
X_3 : Temps (h)	4	5	6

La réalisation de ce plan de Box-Behnken a été effectuée à l'aide du logiciel JMP 10.0, le plan généré (Tableau. 6) comprend 15 essais dont trois répétés au centre du domaine d'étude afin de vérifier l'erreur type et la reproductibilité de la manipulation.

Tableau 6. Plan d'expériences BBD en valeur codée et réelle.

Essai	Quantité d'enzymes (ppm)		Quantité de NaOH (μ L)		Temps (h)	
	X ₁		X ₂		X ₃	
	v. codée	v. réelle	v. codée	v. réelle	v. codée	v. réelle
1	0	30	0	225	0	5
2	-1	25	-1	175	0	5
3	0	30	-1	175	-1	4
4	0	30	0	225	0	5
5	0	30	1	275	-1	4
6	1	35	0	225	1	6
7	0	30	1	275	1	6
8	1	35	1	275	0	5
9	1	35	-1	175	0	5
10	1	35	0	225	-1	4
11	-1	25	1	275	0	5
12	-1	25	0	225	-1	4
13	0	30	-1	175	1	6
14	-1	25	0	225	1	6
15	0	30	0	225	0	5

Où : v. codée représente la valeur codée ; v. réelle la valeur réelle du facteur.

Chapitre V

Résultats et discussions

-V-1- Résultats des mesures de l'acidité

Les résultats des analyses de l'acidité de l'huile dégommée sont présentés dans le tableau 7. En comparant ces valeurs à l'acidité de l'huile brute de soja (égale à 0,45 %), on observe qu'elles sont toutes supérieures à cette dernière. Cette hausse est justifiée par la libération d'AGL dans le milieu, issus de l'action de la Lecitase® Ultra sur les phospholipides par le mécanisme décrit précédemment (Cf. III-1-3).

A partir de ces résultats, nous pouvons donc conclure que l'enzyme a été active au cours des différents essais effectués et permis un dégommage enzymatique.

Tableau 7. Résultats des mesures de l'acidité.

Essai	Quantité	Quantité de	Temps (h)	Acidité % (acide oléique)
	d'enzymes (ppm)	NaOH (μ L)		
	X_1	X_2	X_3	
1	30	225	5	0,525
2	25	175	5	0,49
3	30	175	4	0,5
4	30	225	5	0,48
5	30	275	4	0,5
6	35	225	6	0,48
7	30	275	6	0,5
8	35	275	5	0,5
9	35	175	5	0,47
10	35	225	4	0,48
11	25	275	5	0,5
12	25	225	4	0,505
13	30	175	6	0,48
14	25	225	6	0,51
15	30	225	5	0,52

-V-2- Résultats de la détermination du pH

Les résultats des mesures du pH sont présentés dans le tableau 8 et illustrés graphiquement (figure 10). On remarque que la moyenne des mesures du pH corrigé correspondant à chaque quantité de soude ajoutée, reste toujours dans l'intervalle de pH où l'activité enzymatique se prononce le plus (Cf. III-1-2-1-b). Ceci permet de confirmer que les quantités de soude utilisées sont suffisantes pour amener le pH à un niveau souhaitable à l'activité phospholipasique de l'enzyme.

Cependant, cette méthode de mesure apparaît peu précise et cela se reflète par les importants écarts types observés qui peuvent s'expliquer par la complexité du milieu de mesure ainsi que l'erreur due au matériel qui ne peut être négligée à ce niveau.

Tableau 8. Résultats des mesures du pH

Volume de soude ajouté (μL)	moyenne pH	moyenne pH corrigé	Ecart type pH corrigé
175	4,541	4,281	0,246
225	5,564	5,304	0,112
275	5,742	5,482	0,298

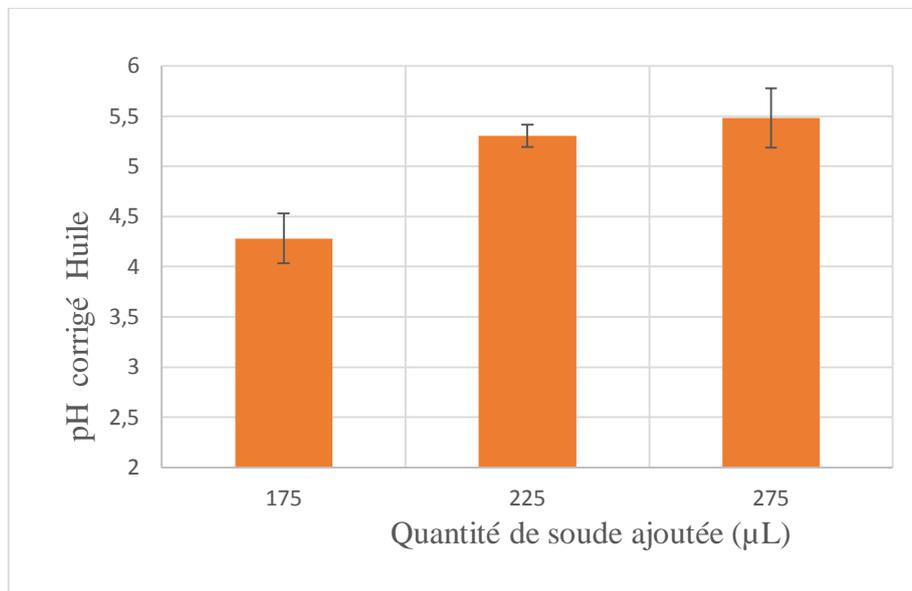


Figure 10. Variation du pH en fonction de la quantité de soude ajoutée.

-V-3- Résultats du plan BBD**-V-3-1- Analyse des résultats**

Les résultats des teneurs en phosphore des 15 essais générés en ordre aléatoire en suivant un plan de BBD, sont présentés dans le tableau 9. Les réponses mesurées varient de 0 à 10 ppm ce qui démontre l'influence des facteurs étudiés. Par ailleurs, on constate que les valeurs mesurées sont nettement en deçà de la limite maximale tolérée à savoir 10 ppm, ce qui nous indique que l'objectif va être atteint, mais nous allons exécuter les calculs afin de trouver la solution la plus avantageuse. Les réponses mesurées sont comparées aux réponses prédites par le modèle, afin de déterminer les résidus qui serviront à évaluer la variance totale.

Tableau 9. Résultats du plan BBD en valeurs mesurées et prédites.

Essai	Quantité d'enzymes (ppm)		Quantité de NaOH (µL)		Temps (h)		Teneur en phosphore (ppm)	
	X ₁		X ₂		X ₃		V. mesurée	V. prédite
	v. codée	v. réelle	v. codée	v. réelle	v. codée	v. réelle		
1	0	30	0	225	0	5	1	1,466667
2	-1	25	-1	175	0	5	6,5	6,75
3	0	30	-1	175	-1	4	10	9,6625
4	0	30	0	225	0	5	1,9	1,466667
5	0	30	1	275	-1	4	4	4,7375
6	1	35	0	225	1	6	4,8	4,7125
7	0	30	1	275	1	6	2,2	2,5375
8	1	35	1	275	0	5	5,5	5,25
9	1	35	-1	175	0	5	9,5	10,325
10	1	35	0	225	-1	4	6,6	6,1125
11	-1	25	1	275	0	5	4	3,175
12	-1	25	0	225	-1	4	4,6	4,6875
13	0	30	-1	175	1	6	7	6,2625
14	-1	25	0	225	1	6	0	0,4875
15	0	30	0	225	0	5	1,5	1,466667

-V-3-2- Analyse de variance

L'analyse de variance (ANOVA) du dégommage enzymatique permet d'étudier l'influence des différents facteurs utilisés dans le modèle et de représenter graphiquement l'importance de chaque facteur sur la teneur en phosphore.

-V-3-2-1- Coefficient de corrélation

L'examen du graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues (figure 11), montre que le modèle rend bien compte des réponses mesurées, car elles appartiennent toutes à l'intervalle de confiance. Le coefficient de corrélation R^2 qui vaut 0,97 confirme cette impression visuelle, en effet plus ce dernier est proche de 1, mieux le modèle explique la réponse étudiée, ce qui suggère que le polynôme du second degré est adéquat pour décrire le comportement du système. Cependant, le R^2 , à lui seul, est insuffisant pour valider le modèle mais permet de passer à l'analyse de variance du modèle.

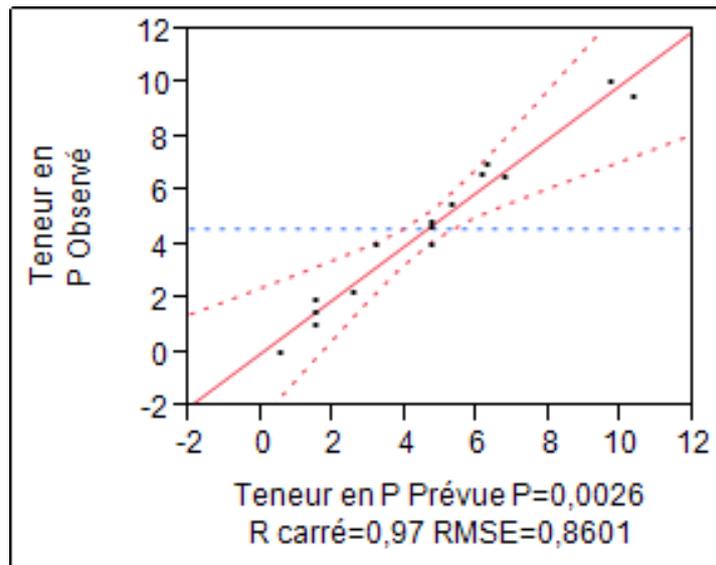


Figure 11. Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues.

-V-3-2-2- Modèle global et manque d'ajustement

L'analyse de la régression du modèle telle que démontrée dans le tableau 10, montre que la moyenne des carrés du modèle est supérieure à la moyenne des carrés des résidus, ce qui indique que la variance du modèle est plus élevée que la variance des résidus. Par ailleurs, la comparaison de ces deux variances par le biais du rapport de Fisher, indique un fort rapport de 18,2008 correspondant à une probabilité de 0.0026. D'après ces résultats, nous pouvons

conclure que le modèle décrit une significativité très convaincante de la réponse expérimentale y de la teneur en phosphore, à un intervalle de confiance de 95%.

D'autre part, on observe que le rapport de Fisher des carrés des moyennes du défaut d'ajustement est de 5,3975 avec une probabilité qu'ils soient égaux de 0,1603. L'erreur d'ajustement ainsi que l'erreur expérimentale peuvent être calculées à partir de la racine carrée du carré moyen correspondant à chaque valeur. On trouve respectivement 1,0476 et 0,4509, le rapport de ces deux valeurs 2,32 permet de conclure que l'erreur d'ajustement du modèle est simplement un peu plus du double de l'erreur expérimentale.

Tableau 10. Analyse de variance du modèle.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré des moyennes	Rapport F	Prob. > F
<i>Analyse de la variance</i>					
Modèle	9	121,19017	13,4656	18,2008	0,0026*
Résidus	5	3,69917	0,7398		
Total	14	124,88933			
<i>Défaut d'ajustement</i>					
Défaut d'ajustement	3	3,2925	1,0975	5,3975	0,1603
Erreur pure	2	0,4066667	0,20333		
Erreur totale	5	3,6991667			

-V-3-2-3- Effets des facteurs

Suite à la vérification du modèle par le test d'ANOVA, on peut à présent déduire l'influence des paramètres sur la réponse : teneur en phosphore. Chaque paramètre est caractérisé par une probabilité p qui correspond à la probabilité de se tromper en supposant que le paramètre est significatif. Ainsi, un paramètre est considéré significatif si $p < 0.05$, c'est-à-dire, plus la valeur de p est faible, plus le paramètre est significatif. Par ailleurs, plus la différence entre la valeur du coefficient et l'écart type est grande, plus le facteur est jugé influent. Cela peut aussi être effectué en comparant le rapport entre le coefficient et l'écart type qu'on appelle « t de student ».

Les résultats obtenus et illustrés dans le tableau 11 permettent d'évaluer les effets des facteurs:

Tableau 11. Tableau des estimations des coefficients.

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.> t
Constante (a_0)	9,7229167	2,785775	3,49	0,0175*
Effet linéaire				
X1	0,2825	0,060821	4,64	0,0056*
X2	-0,04325	0,006082	-7,11	0,0009*
X3	-1,4	0,304104	-4,6	0,0058*
Effet quadratique				
X1* X1	0,0621667	0,017905	3,47	0,0178*
X2* X2	0,0013417	0,000179	7,49	0,0007*
X3*X3	0,9791667	0,447629	2,19	0,0804
Effet d'interaction				
X1* X2	-0,0015	0,00172	-0,87	0,4231
X1*X3	0,14	0,086014	1,63	0,1645
X2* X3	0,006	0,008601	0,7	0,5165

* significatif à $p < 0,05$

➤ **Effet linéaire**

Les probabilités suffisamment basses et inférieures à 0.05 pour les trois facteurs étudiés indiquent une significativité très convaincante de ces derniers sur la teneur en phosphore.

On remarque que le facteur, le plus influent et significatif est la quantité de soude, qui présente la plus faible probabilité et un t de student en valeur absolue élevé ($p = 0,0009$; $|t| = 7.11$), ce facteur présente également un effet négatif ($a_1 = - 0,04325$). Les deux autres facteurs, à savoir quantité d'enzymes et le temps, ont une influence et une significativité très satisfaisante avec respectivement une probabilité de : 0,0056 ; 0,0058 et un $|t|$ de student de 4,64 ; 4,6. Aussi, la quantité d'enzyme présente un effet positif ($a_1 = 0,2825$) tandis que le temps a un effet négatif ($a_3 = - 1,4$).

Ces résultats confirment d'une part, l'importance de la soude ajoutée au cours du dégommeage pour l'ajustement des conditions optimales afin d'avoir un pH favorable à l'activité enzymatique. D'autre part, ils corroborent l'importance des deux autres facteurs étudiés.

➤ **Effet quadratique**

Les effets quadratiques présentés dans le tableau 11, permettent de confirmer l'influence hautement significative de la quantité de soude ($p = 0,0007$; $|t| = 7,49$) et de la quantité d'enzymes ($p = 0,0178$; $|t| = 3,47$). Cependant, le temps apparaît légèrement non significatif avec une probabilité de $0,0804 > 0,05$.

Ces résultats démontrent l'importance primordiale de la quantité de soude et d'enzymes sur le bon déroulement du dégomme enzymatique. Le temps de réaction bien que non significatif n'en demeure pas moins.

➤ Effet d'interaction

Les effets d'interactions des différents facteurs étudiés et démontrés dans le tableau 11, montrent que ces derniers ne sont pas du tout significatifs en raison de leurs probabilités élevés. Nous présentons en détails ces différentes interactions ainsi que leurs surfaces de réponses:

▪ Interaction quantité d'enzymes – quantité de soude

La probabilité élevée de 0,4231 impliquant la non-significativité de cette interaction s'explique par l'absence de variation de l'effet du facteur quantité d'enzymes lorsque le facteur quantité de soude varie du niveau bas au niveau haut. En effet, il n'existe pas de synergie entre ces deux quantités.

La figure 12 montre la surface de réponse de l'optimisation (minimisation) de la teneur résiduelle en phosphore. Les quantités de soude et d'enzymes sont variées durant la construction du plan, tandis que le facteur temps est fixé à son optimum: $X_3 = 5,90$ h. On cherche ici à obtenir une teneur résiduelle en phosphore inférieure à 2 ppm.

Cette figure permet également de mieux illustrer l'effet négatif de la quantité de soude, qui au-delà d'une certaine concentration tend à rendre le pH du milieu alcalin, chose qui n'est pas favorable à l'activité phospholipasique ainsi que la stabilité de la Lecitase® Ultra (YANG et al., 2006 ; WANG et al., 2010).

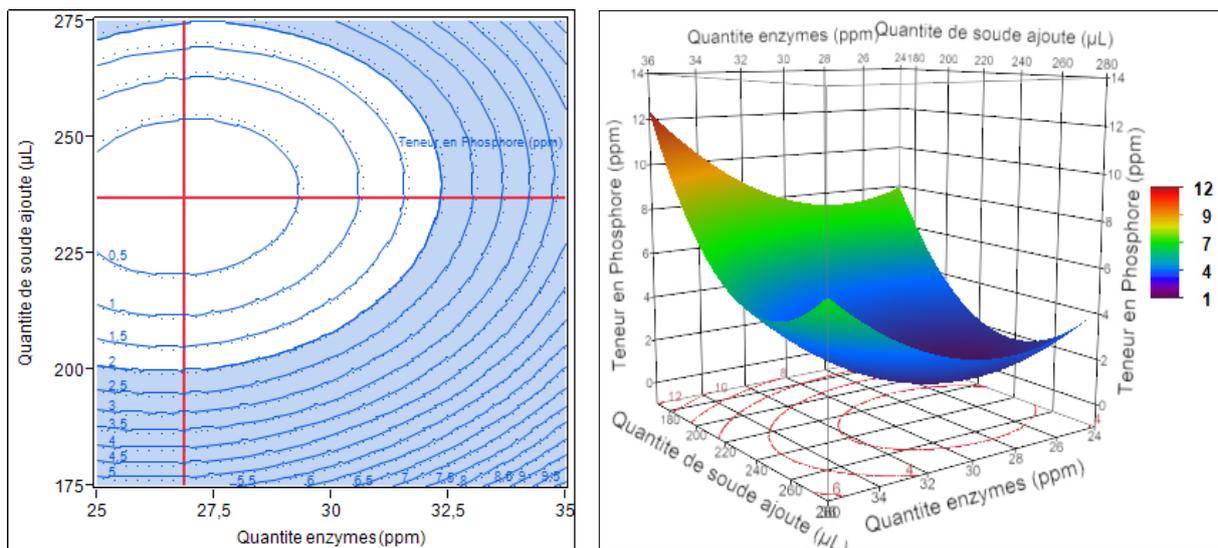


Figure 12. Surface de réponse de l'effet des quantités d'enzymes et de soude sur la teneur en phosphore.

▪ Interaction quantité d'enzymes – temps

L'interaction entre ces deux paramètres est également non significative et cela en raison de la probabilité égale à 0,1645 et largement supérieure à 0,05. On peut traduire cela, par le fait que l'effet du facteur quantité d'enzymes ne dépend pas du niveau du facteur temps et cela pour une valeur fixée de la quantité de soude à son niveau optimal (237,34 μ L). La figure 13, permet d'apprécier la zone d'optimisation du dégommage enzymatique ($[P] < 2$ ppm).

On observe également, une diminution progressive de la teneur en phosphore au cours du temps de réaction jusqu'à atteindre la valeur d'optimisation, cela a été vérifié par plusieurs études (CLAUSEN *et al.*, 2000 ; MÜNCH, 2004). Par ailleurs, l'effet négatif du temps est justifié car au-delà de la zone optimale, celui-ci induira une augmentation de la teneur en phosphore et cela indépendamment de la quantité d'enzymes. LIST *et al.*, (1981) ont expliqué ce phénomène par le comportement que peut avoir les gommages. En effet, celles-ci une fois rendues hydratées et en solution, peuvent à nouveau se retrouver dans l'huile dans le cas où le temps de la réaction serait prolongé.

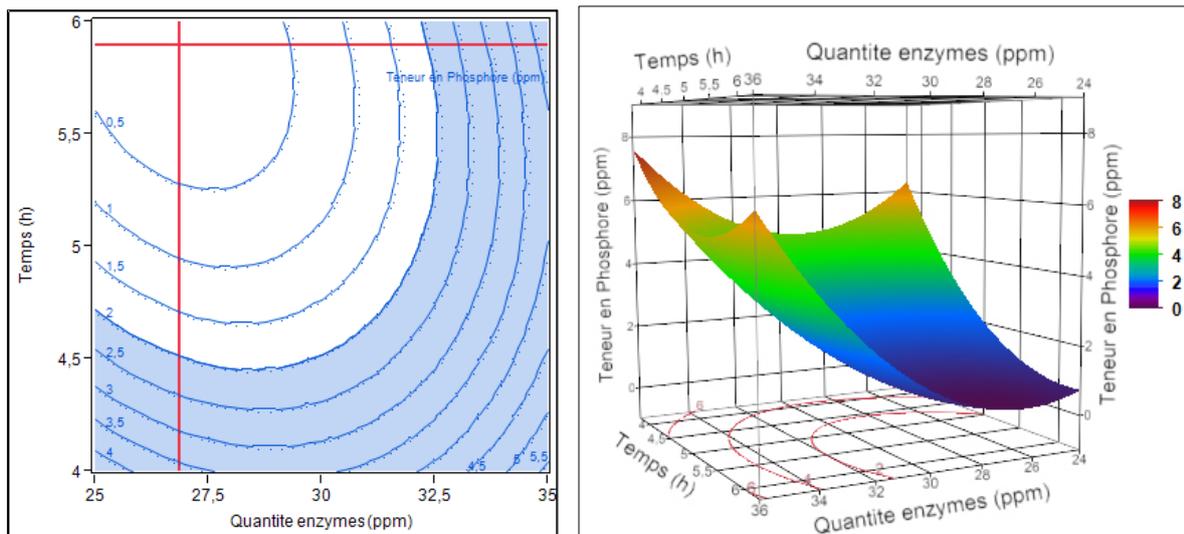


Figure 13. Surface de réponse de l'effet de la quantité d'enzymes et du temps sur la teneur en phosphore.

▪ Interaction quantité de soude – temps

Pour cette interaction, le même constat est observé. La probabilité élevée de 0,5165 est synonyme de non signifiante de cette interaction, ce qui revient à conclure que l'effet du temps sur le dégommage n'est pas dépendant de la quantité de soude, le même raisonnement peut être démontré pour l'effet de la quantité de soude.

La figure 14 permet de bien distinguer la zone d’approvisionnement maximale en phosphore pour une quantité d’enzymes optimale (26,86 ppm).

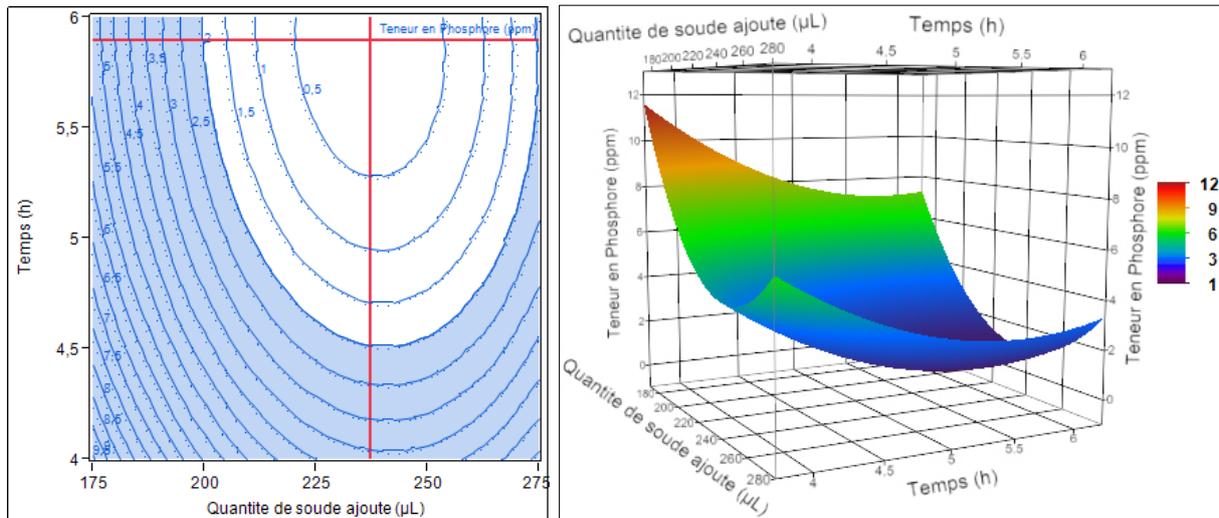


Figure 14. Surface de réponse de l’effet de la quantité de soude et du temps sur la teneur en phosphore.

-V-3-3- Modèle mathématique

D’après les résultats obtenus précédemment (tableau 11), le modèle mathématique peut se présenter sous la forme d’un polynôme de second degré qui permet de décrire la réponse par la relation suivante :

$$y = 9,7229 + 0,2825x_1 - 0,0432x_2 - 1,4x_3 + 0,0621x_1^2 + 0,0013x_2^2$$

Ce modèle, exprimé pour les valeurs réelles, a été volontairement simplifié par élimination des effets jugés non significatifs dans l’analyse précédente.

On peut également présenter ce modèle pour les unités codées d’après les résultats de l’estimation des coefficients (annexe 8):

$$y = 1,4666 + 1,4125x_1 - 2,1625x_2 - 1,4x_3 + 1,5541x_1^2 + 3,35417x_2^2$$

-V-3-4- Optimisation

Les conditions optimales du dégomme enzymatique de l'huile de soja ont été déterminées pour obtenir une teneur résiduelle en phosphore minimale. Le modèle polynomial du second degré obtenu précédemment a été utilisé à cet effet.

En appliquant la méthode de la fonction désirabilité pour minimiser la réponse (annexe 7), les conditions optimales obtenues sont décrites ci-dessous et comparées aux conditions habituelles du dégomme enzymatique (tableau 12).

On remarque que la solution proposée permet d'atteindre une quantité de phosphore de 0,125 ppm après un temps de réaction de 5.9 h. Cette solution paraît très satisfaisante, à la fois largement inférieure à la teneur maximale en phosphore tolérée à la sortie du séparateur (10 ppm) et bien meilleure que le résultat moyen obtenu habituellement au niveau de la chaîne de production. Elle permet également, de faire une économie non négligeable d'enzymes. Cependant, il apparaît que cette solution nécessite une quantité de soude un peu plus importante afin de ramener le pH du milieu réactionnel à un niveau optimal à l'activité de l'enzyme, les résultats des analyses du pH (Cf. -V-2) permettent néanmoins, d'estimer cette valeur aux alentours de 5, appuyant ainsi ce qui a été décrit précédemment dans le paragraphe III-1-2-1-b.

Tableau 12. Solution optimale du dégomme enzymatique et comparaison aux conditions habituelles (pour 200g d'huile brute à traiter).

Variable	Conditions habituelles du dégomme	Solution d'optimisation
Quantité d'enzymes (ppm)	40	26,861863
Quantité de soude (µL)	231,4	237,34784
Temps de réaction (h)	6	5,9
Teneur en phosphore résiduelle (ppm)	10-15	0,125393

A ce niveau de notre étude, bien que le modèle mathématique ait été validé, il est nécessaire de procéder à la réalisation d'essais afin de confirmer les prévisions du plan d'expériences et le bien-fondé des résultats de l'optimisation. Pour cela, trois essais en respectant les valeurs de la solution optimale de chaque facteur doivent être réalisés. Les résultats de la teneur en phosphore obtenus devront confirmer les prévisions.

Enfin, en vue de la faible teneur en phosphore prévue par le modèle pour cette optimisation et si cette dernière s'avérait confirmée, il serait judicieux de vérifier l'acidité de l'huile à la fin

du dégommage enzymatique. Une augmentation trop importante de l'indice d'acide de l'huile signifierait que l'enzyme s'est attaquée aux triglycérides libérant ainsi des AGL, avec des répercussions directes sur la qualité de l'huile et le bon déroulement du reste du procédé de raffinage. Dernier point à vérifier, le risque de saponification parasite lié à la quantité de soude utilisée et les répercussions qu'elle pourrait entraîner à savoir : production de savon et augmentation de la perte en huile.

Conclusion

Conclusion

Première étape du raffinage des huiles végétales brutes, le dégommeage en constitue une opération cruciale pour le bon déroulement des étapes ultérieures. Plusieurs méthodes ont été mises au point à cet effet, l'une des plus récente en la matière est le dégommeage enzymatique faisant intervenir des enzymes afin d'augmenter l'hydratabilité des phosphores et en favoriser ainsi l'élimination.

Cette étude effectuée au niveau du laboratoire de recherche et développement de CEVITAL a pour objectif d'optimiser le dégommeage enzymatique utilisant la Lecitase® Ultra et cela afin d'assurer des teneurs en phosphore minimale tout en cherchant à réduire les coûts de fabrication. Nous avons pour cela fait varier les quantités de soude et d'enzymes utilisées ainsi que le temps de réaction en optant pour un plan d'expériences de Box-Behnken.

Les résultats obtenus pour les analyses du pH et de l'acidité confirment que l'enzyme a été active et permis un dégommeage, ceci est par ailleurs vérifié par les résultats des teneurs en phosphore des différents essais du plan BBD qui s'avèrent très concluant, bien au-dessous de la limite maximale tolérée. L'analyse des résultats du plan d'expériences a confirmé l'importance des facteurs étudiés, les quantités d'enzymes et de soude ajoutées présentent une plus grande influence que le temps.

Les résultats de l'optimisation obtenue: quantité d'enzymes de 26,86 ppm, quantité de soude de 237,34 μ L et un temps de réaction de 5,9 heures, sont très satisfaisants. Ils permettent d'effectuer une économie non négligeable de la quantité d'enzymes utilisée de l'ordre de 13,14 ppm, tout en ayant un rendement maximal représenté par une teneur en phosphore de 0,12 ppm. Ces résultats devront par ailleurs être validés en effectuant la vérification de la vraisemblance du modèle.

En perspective nous suggérons :

- Examiner les différentes solutions possibles à partir des surfaces de réponses obtenues et tenter de trouver celle offrant le meilleur compromis en se basant sur une étude technico-économique.
- Effectuer la vérification de l'activité de la solution enzymatique de Lecitase® Ultra avant utilisation.

- Prendre en compte d'autres paramètres influençant le dégomme enzymatique tels que : la vitesse d'agitation, la température, le dosage d'acide citrique. Cela permettra d'affiner le modèle mathématique et d'obtenir ainsi un modèle qui se rapproche le plus que possible de la réalité.
- Pour les futurs essais de dégomme à échelle laboratoire, il serait préférable d'utiliser un agitateur à cisaillement de type Ultra Turax après ajout de chaque réactif, afin d'obtenir une bonne homogénéisation.
- Utilisation d'un pH-mètre muni d'un diaphragme à manchon et d'un électrolyte à base de LiCl dans l'acide acétique, pourrait permettre une mesure directe du pH dans l'huile.

*Références
bibliographiques*

A

Aalrust E, Beyer W, Ottofrickenstein H, Penk G, Plainer H, Reiner R (1993) Enzymatic treatment of edible oils. US Patent 5,264,367 assigned to Röhm GmbH and Metallgesellschaft AG.

C

Cahuzac-Picaud, M. (2010). Les huiles végétales, intérêt diététique et gastronomique. *Phytothérapie*, 8(2), 113-117. doi: 10.1007/s10298-010-0541-1

Clausen et al. (2000). Methode for reducing phosphorus content of edible oil. US patent 6,103,505 assigned to Novo Nordisk A/S Bagsvaerd, Denmark

D

Dijkstra^(a), A. J. (2011, 02 20). refining- Introduction to degumming. Récupéré sur AOCS: <http://lipidlibrary.aocs.org/processing/degum-intro/index.htm>.

Dijkstra^(b), AlbertJ. (2013). Degumming Edible Oil Processing from a Patent Perspective (pp. 121-155): Springer US.

E

Ericksson. (1989). Huile de soja - Méthodes de traitement et utilisations actuelles. American soybean association, 1-21.

F

FAO. (2012). *Oilseeds market summary*. FAO - Trade and market division.

Faur, L. (1988). Les industries agricoles et alimentaires: Tec & Doc.

G

Galhardo, F., & Dayton, C. (2012, 03 16). Edible Oil Processing, enzymatic degumming. Récupéré sur AOCS Lipid Library: <http://lipidlibrary.aocs.org/processing/degum-enz/index.htm>.

Goupy, J. (2005). *Pratiquer Les Plans d'expériences*. Dunod/ L'usine Nouvelle.

Gunstone, Frank D., & Wang, Tong. (2002). VEGETABLE OILS IN FOOD TECHNOLOGY: Composition, Properties and Uses.

H

Hvolby, A. (1971). Removal of nonhydratable phospholipids from soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(9), 503-509. doi: 10.1007/BF02544671

K

Karleskind , Alain, & J.Denise. (1992). Manuel des corps gras (Vol. 2). Paris, France: Tec & Doc - Lavoisier.

Kartika, Ika Amalia. (2005). NOUVEAU PROCÉDE DE FRACTIONNEMENT DES GRAINES DE TOURNESOL : expression et extraction en extrudeur bi-vis, purification par ultrafiltration de l'huile de tournesol. (DOCTEUR), INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE. (2223).

L

Liu, KeShun. (1997). Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components Soybeans (pp. 25-113): Springer US.

List, G. R., Avellaneda, J. M., & Mounts, T. L. (1981). Effect of degumming conditions on removal and quality of soyabean lecithin. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 58,892-898.

Lusas Edmund W., Mohammad S. Alam, Richard C. Clough, and Mian N. Riaz. (2012). Animal and Vegetable Fats, Oils, and Waxes. J.A. Kent (ed.), *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*, 34, pp 1323-1402. doi: 10.1007/978-1-4614-4259-2_34,#Springer.

M

Matthäus, Bertrand. (2012). Oil Technology. Technological Innovations in Major World Oil Crops, Volume 2, 23-92. doi: 10.1007/978-1-4614-0827-7_2.

Mishra, Mithilesh Kumar, & al. (2009). Lipase activity of Lecitase® Ultra: characterization and applications in enantioselective reactions. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20(24), 2854-2860. doi: 10.1016/j.tetasy.2009.11.012.

Münch, E.-W. (2004). Enzymatic degumming processes for oils from soya, rape and sun. (pp. 1-47). Lippro consulting.

N

Novozymes, Lecitase® Ultra, Oils and Fats/2002-005894-03, Novozymes,AS, 2002.

P

Pagès-xatart-parès, Xavier. (2008). Technologies des corps gras (huiles et graisses végétales).pdf>. *Techniques de l'ingénieur*, f6070, 24.

Petrauskaitė, V. & al. (2000). Physical refining of coconut oil: Effect of crude oil quality and deodorization conditions on neutral oil loss. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(6), 581-586. doi: 10.1007/s11746-000-0093-6.

Platon, J.F. (2008). Raffinage de l'huile de soja. *American soybean association*, 19, 3-30.
Proctor, Andrew. (1997). *Soybean Oil Extraction and Processing*: Springer US.

Pryde, E.H. 1980. Composition of soybean oil. Ch. 2. In *Handbook of Soy Oil Processing and Utilization*. S.R. Erickson, E.H. Pryde, O.L. Brekke, T.L. Mounts, and R.A. Falb, (Ed.), p. 13. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL.

\mathcal{R}

Richmond, Gregory S., & Smith, Terry K. (2011). Phospholipases A1. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 588-612.

Ranken, M. D., Kill, R. C., & Baker, C. (1997). Fats and Fatty Foods. In M. D. Ranken, R. C. Kill & C. Baker (Eds.), *Food Industries Manual* (pp. 272-315): Springer US.

 \mathcal{S}

Sadeghi, & Mona. (2010). Purification of soybean oil with phospholipase A1 (Vol. 46). Heidelberg, ALLEMAGNE: Springer.

Sleeter, R. T. (1981). Effects of processing on quality of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(3), 239-247. doi: 10.1007/BF02582349.

 \mathcal{T}

Tinsson, Walter. (2010). La notion de plan d'expérience *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques* (Vol. 67, pp. 3-37): Springer Berlin Heidelberg.

 \mathcal{W}

Wang, Yong, Zhao, Mouming, Song, Keke, Wang, Lili, Tang, Shuze, & Riley, William W. (2010). Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase A1 (Lecitase Ultra). *Food Chemistry*, 121(4), 1066-1072. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.01.051.

Wiedermann, L. H. (1981). Degumming, refining and bleaching soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(3), 159-166. doi: 10.1007/BF02582328.

Woerfel, John B. (1990). Techniques de production de l'huile de soja et produits derives de haute qualite. *American Soybean Association*, 1-9.

 \mathcal{Y}

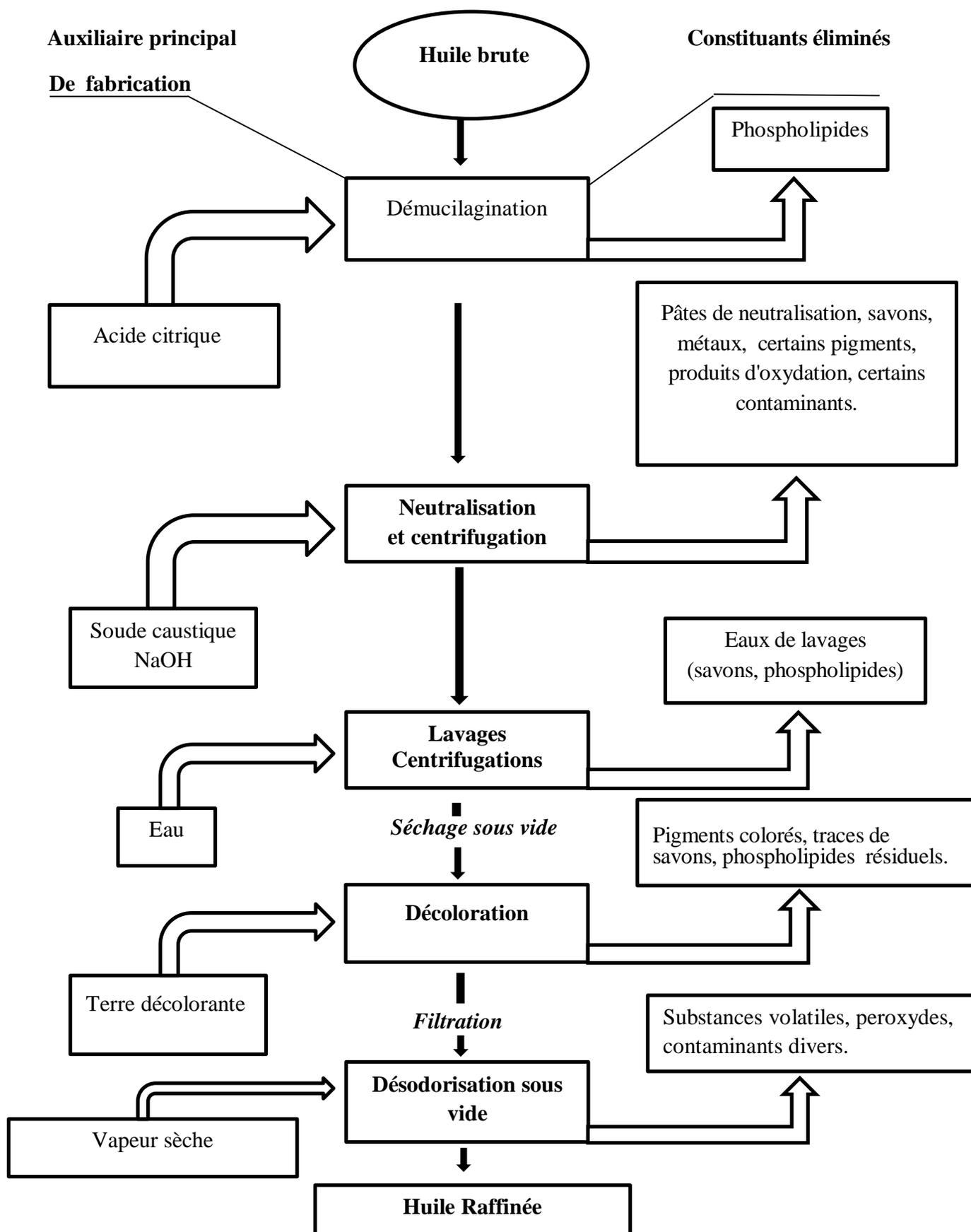
Yang, Bo, Zhou, Rong, Yang, Ji-Guo, Wang, Yong-Hua, & Wang, Wei-Fei. (2008). Insight into the Enzymatic Degumming Process of Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(5), 421-425. doi: 10.1007/s11746-008-1225-y.

Yang, J.-G., & al. (2006). Degumming of Vegetable Oil by a New Microbial Lipase. *Food Technology & Biotechnology*, 44, 101-104.

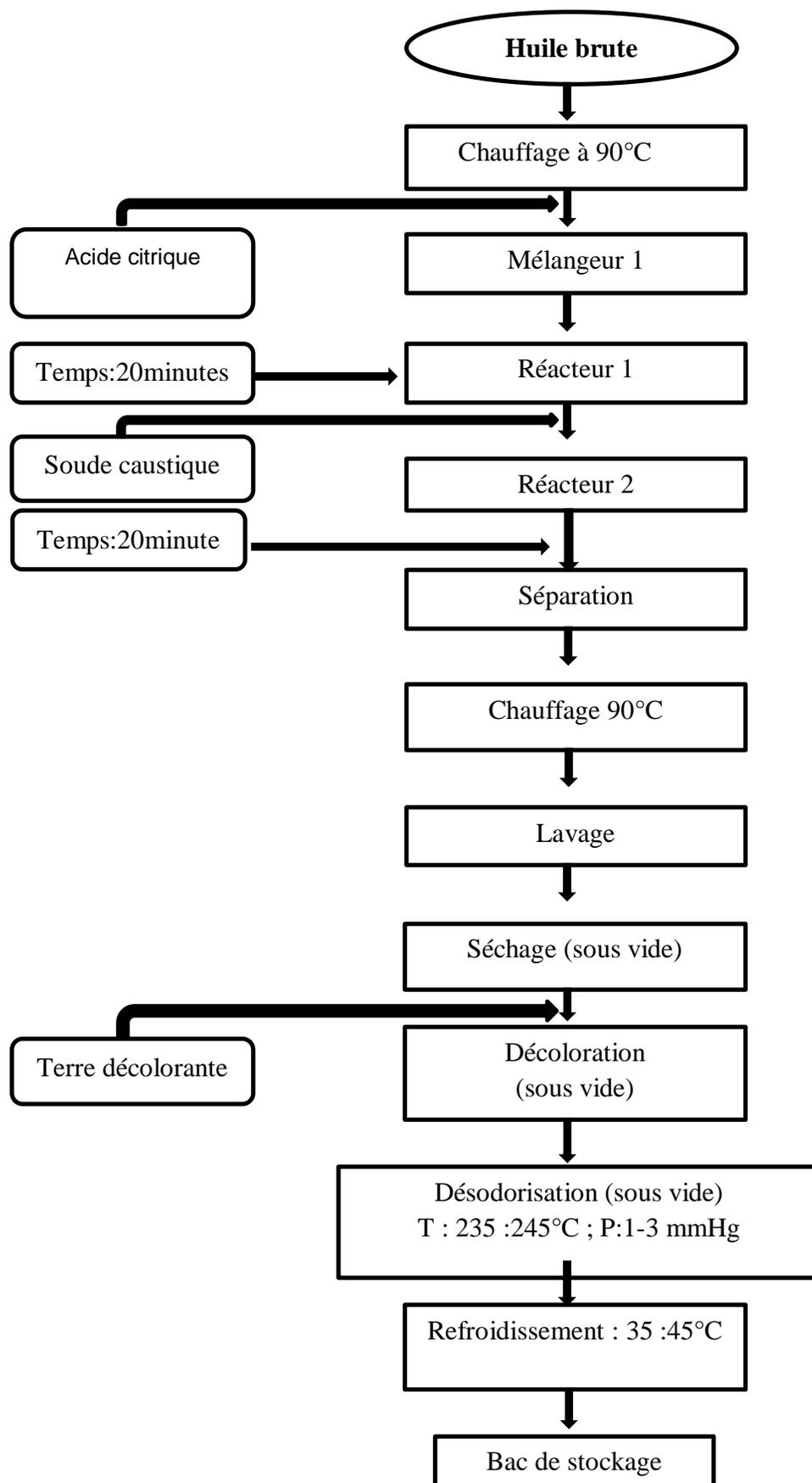
Yu, Dianyu, Ma, Ying, & al. (2013). Characterization of immobilized phospholipase A1 on magnetic nanoparticles for oil degumming application. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 519-525. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.014>.

Annexes

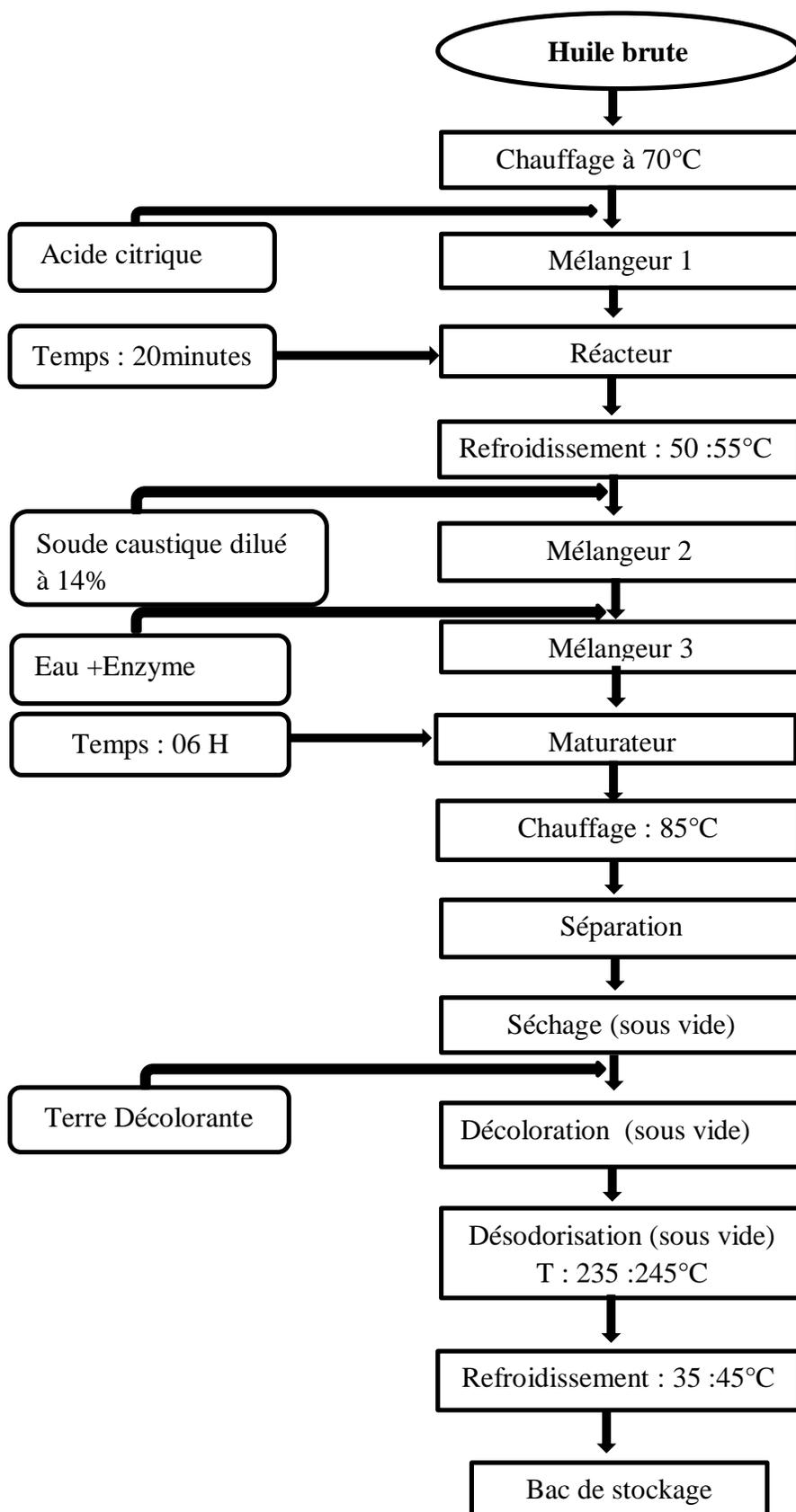
Annexe 1. Diagramme générale du raffinage des huiles végétales.



Annexe 2. Diagramme de raffinage chimique.



Annexe 3. Diagramme de raffinage enzymatique



Annexe 4. Bulletin d'analyse physico-chimique de l'huile brute de soja utilisée.

BULLETIN D'ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE MATIERE PREMIERE

Nature du produit : HUILE BRUTE DE SOJA

Analyses	Unité	Résultats	Normes	Normes d'essai
Acidité	% (acide oléique)	0.45	1.25 Max	ISO 660 Deuxième édition 1996-05-15
Indice de peroxyde	meq O ₂ / kg MG	4.2	15 Max	ISO 3960 Quatrième édition 2007-07-15
Impuretés insolubles	%	0.02	0.5 Max	ISO 663 Quatrième édition 2007-03-01
Humidité et matières volatiles à 105°C	%	0.09		ISO 662 Deuxième édition 1998-09-15
Couleur Lovibond 1P :	Jaune Rouge	70 4.3	-	ISO 15305 Première édition 1998-09-15
Densité à 20°C	-	0.919	0.919 - 0.925	Méthode conventionnelle
Indice de réfraction à 40°C	-	1.467	1.466 - 1.470	ISO 6320 Quatrième édition 2000-03-15
Indice d'iode	-	133	124 - 139	ISO 3961 Troisième édition 1996-06-01
Indice de saponification	mg KOH / g MG	190	189 - 195	ISO 3657 Troisième édition 2002-06-01
Insaponifiables	g/KG	6.9	15 Max	ISO 18609 Première édition 2000-08-15
Phosphore	ppm	78	250 Max	A.O.C.S. méthode off ca 12.55 Corrigée 1992
Odeur et saveur	Caractéristiques au produit			

Annexe 5. Fiche de données du produit: Lecitase® Ultra



Lecitase® Ultra

Valid From 2007-07-11

Product Characteristics:

Declared Enzyme	Lipase
Declared Activity	10 KLU/g
Colour	Brown Colour can vary from batch to batch. Colour intensity is not an indication of enzyme activity.
Physical form	Liquid
Production organism	Aspergillus oryzae
Donor organism	Thermomyces lanuginosus Produced by submerged fermentation of a genetically modified micro organism. The enzyme protein, which is protein engineered, is separated and purified from the production organism.

Product Specification:

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Lipase Units KLU	10		/G
Total Viable Count	-	50000	/G
Coliform Bacteria	-	30	/G
Enteropathogenic E.Coli	Not Detected		/25 g
Salmonella	Not Detected		/25 g

The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes given by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemical Codex (FCC).

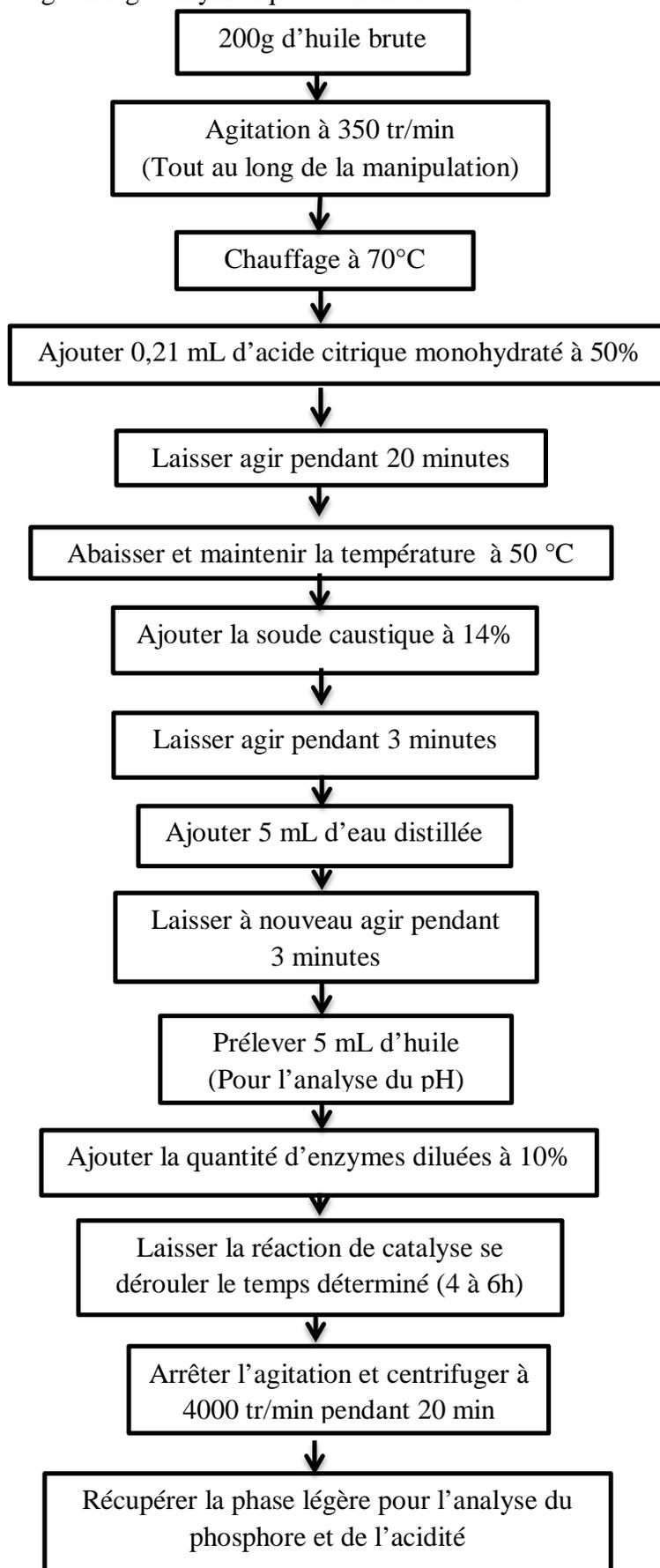
Packaging: See the standard packaging list for more information.

Recommended Storage:

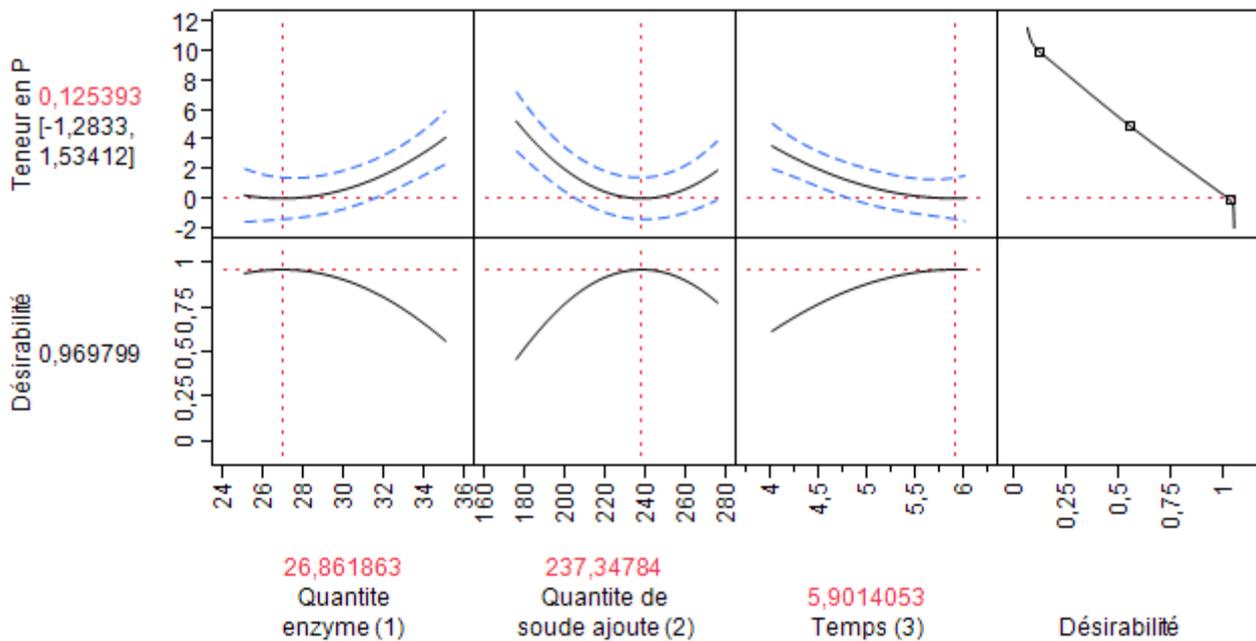
Best before	When stored as recommended, the product is best used within 3 months from date of delivery.
Storage at customer's warehouse	0-10°C (32°F-50°F)
Storage Conditions	In unbroken packaging - dry and protected from the sun. The product has been formulated for optimal stability. Extended storage or adverse conditions such as higher temperature or higher humidity may lead to a higher dosage requirement.

Safety and Handling Precautions

Enzymes are proteins. Inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact. The product may create easily inhaled aerosols if splashed or vigorously stirred. Spilled product may dry out and create dust. Spilled material should be flushed away with water. Avoid splashing. Left over material may dry out and create dust. Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection as prescribed on the warning label. Wash contaminated clothes. A Material Safety Data Sheet is supplied with all products. See the Safety Manual for further information regarding how to handle the product safely.

Annexe 6. Diagramme dégomme enzymatique à échelle laboratoire

Annexe 7. Profil de prévision et fonction désirabilité appliquée pour minimiser la réponse.

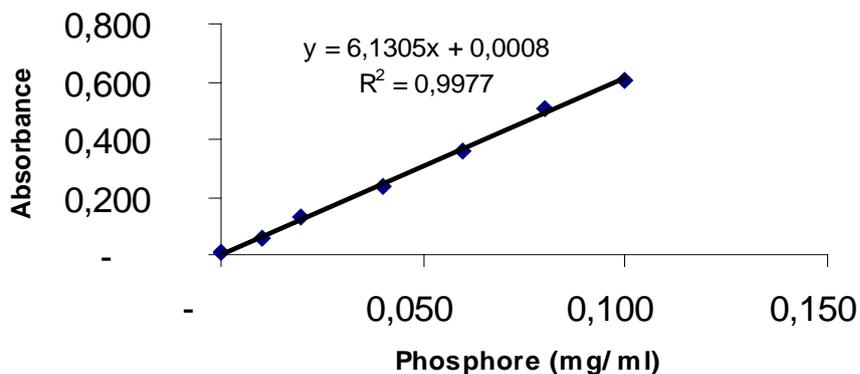


Annexe 8. Estimation des coefficients en unités codées.

Estimations des coefficients (valeurs codées)

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.> t
Constante	1,4666667	0,4966	2,95	0,0318*
1	1,4125	0,304104	4,64	0,0056*
2	-2,1625	0,304104	-7,11	0,0009*
3	-1,4	0,304104	-4,60	0,0058*
1*1	1,5541667	0,447629	3,47	0,0178*
1*2	-0,375	0,430068	-0,87	0,4231
2*2	3,3541667	0,447629	7,49	0,0007*
1*3	0,7	0,430068	1,63	0,1645
2*3	0,3	0,430068	0,70	0,5165
3*3	0,9791667	0,447629	2,19	0,0804

Annexe 9. Courbe d'étalonnage dosage du phosphore



Résumé

La méthodologie de surface de réponse a été utilisée pour déterminer les conditions optimales du dégommage enzymatique de l'huile brute de soja. Dans cette étude, les effets de trois paramètres influençant ce procédé à savoir : la quantité d'enzymes, la quantité de soude ajoutée et le temps de réaction ont été évalués en adoptant le plan d'expériences de Box-Behnken. L'efficacité du dégommage a été appréciée en suivant la teneur en phosphore résiduelle. Le modèle polynomiale de second degré obtenu décrit de manière satisfaisante la réponse étudiée et permet de faire ressortir une influence significative pour l'effet de la quantité d'enzymes et de soude, le paramètre temps influe quant à lui mais de manière moins significative. En appliquant la fonction désirabilité pour minimiser la teneur en phosphore, les conditions optimales d'opération permettent d'obtenir une teneur minimale en phosphore de 0,125 ppm pour une quantité d'enzymes de 26,86 ppm, une quantité de soude de 237,34 μL et un temps de réaction de 5,9 heures.

Mots clés : Optimisation, dégommage enzymatique, huile de soja, méthodologie de surface de réponse.

Abstract

Response surface methodology was used to determine the optimum processing conditions for enzymatic degumming of crude soybean oil. In this study, effects of three factors: amount of soda, dosage of enzyme and the reaction time were investigated using Box-Behnken design of experiments. Efficiency of degumming was appreciated by following phosphorus content. Second-order polynomial model obtained describe satisfactorily the response studied and brings out a significant influence of the effect of the amount of enzymes and soda, the time factor influences, but less significantly. Applying desirability function to minimize phosphorus, optimal operating conditions were found to be enzyme dosage of 26,86 ppm, amount of soda 237,34 μL during 5,9 hours. At this optimum point, phosphorus content of degummed soybean oil was found to be 0,125 ppm.

Keywords: Optimization, enzymatic degumming, soybean oil, response surface methodology.