

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Microbiologie

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat En Génie Biologique

Thème

*Etude comparative de l'activité lipasique et
phospholipasique de la phospholipase A₁ libre et
immobilisée sur le charbon actif*

Présenté par :

- *Mlle GADOUM SOUMIA*
- *Mlle MOUALEK HIBA*

Devant le jury :

Présidente : BOUCHERBA NAWEL MCB Université de Bejaia

Examinatrice : CHIBANE NOUARA MAA Université de Bejaia

Promoteur : BOUKERROUI ABDELHAMID MCA Université de Bejaia

Promotion : 2013-2014



Remerciements

Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier ALLAH de 'nous avoir remis sur la voie des études et de nous avoir donné la volonté et le courage pour achever ce travail ;

NOUS exprimons nos vifs remerciements à notre promoteur monsieur Abdelhamid BOUKERROUI avec qui nous avons eu le grand plaisir de travailler tout le long de ce mémoire.

Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements

à :

Melle BOUCHERBA .N d'avoir accepté de présider le jury et de juger notre travail.

M^{me}CHIBANE.N d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Monsieur KERNANI .R., doctorant à l'université de Bejaia, pour son soutien, son enthousiasme et ses conseils avisés, à travers nos discussions qui nous permis de mener à bien ce travail.

Je remercie également tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail en particulier Monsieur
BETTACHE et MESSISSE.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail

A mes deux chers parents qui m'ont soutenu pendant de longues années d'études moralement et financièrement

A mes aimables sœurs : nawal, yasmina, fouzia, yousra.

*A mes aimables Houcine et sa femme Kafia,
Abd el karim et sa femme Fatma, Adel et Mustapha.*

A mes très chères nièces : Nourcine et Maroua .

*A mes amies Hanane, Amel, Cherifa, Samira, Hayatte, Radia
Nadjate, Akila et Kenza.*

A mon binôme Hiba et sa famille.

*A toute personne qui m'est chère au cœur et qui m'a aidé de
près ou de loin.*

Et enfin à toute la promotion Génie Biologie 2014

SOUMIA



DEDICACES

Je dédie ce modeste travail

A mes deux chers parents qui m'ont soutenu pendant de longues années d'études moralement et financièrement

A mes aimables sœurs : nawal, yasmina.

*A mes aimables frères : adel et sa femme fatima ,
morad et idir.*

A mes très chères nièces : Assma et Ritele

*A mes amies Hayatte, chrifa , nora , nedjma et kahina , lamia
christele linda fatima karima .*

A mon binôme soumaia et sa famille.

*A toute personne qui m'est chère au cœur et qui m'a aidé de
près ou de loin.*

Et enfin à toute la promotion Génie Biologie 2014

HIBA



Table des matières

Liste des tableaux.
Liste des figures
Liste des abréviations
Introduction.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I-1- Soja.....3
I-2-Définition de l’huile de soja.....3
I-3- Raffinage des huiles.....3
I-4- Dégommage de l’huile brute.....4
 I-4-1-Application de la phospholipase dans le dégommage de l’huile.....5
 I-4-2- La Phospholipase A₁ ou Lécitase Ultra6
 I-4-3-Le mode d’action de la Lecitase Ultra7
I-5- Immobilisation des enzymes.....8
 I-5-1-Techniques d’immobilisation.....8
 I-5-2-Principe de l’immobilisation par adsorption.....8
 I-5-3-Application de charbon actif comme support d’immobilisation des enzymes.....9
 a- Charbon actif9

Chapitre II : Matériel et méthodes

II-1- Matériel.....10
 II-1-1- Enzyme.....10
 II-1-2-Support pour l’immobilisation.....10

II-1-3- Autres produits et réactifs chimiques utilisés.....	10
II-2- Méthodes	
II.2.1 Méthodes analytiques	11
a-dosage des protéines	11
b-Teneur en protéine dans le support	11
c- Calcul du rendement.....	11
II.2.2 préparation des solutions tampons.....	11
II.2.3 Immobilisation de la PLA ₁ : protocole expérimental	12
II.2.4 Détermination de l'activité de l'enzyme libre.....	12
a-Activité lipasique.....	12
b-Activité phospholipasique.....	12
II.2.5. Détermination de l'activité de l'enzyme immobilisée	12
II.3. Caractérisation de la PLA ₁ libre et immobilisée.....	13
II.3.1. Effet de pH sur l'activité lipasique et phospholipasique de l'enzyme.....	13
II.3.2. Effet de la température sur l'activité lipasique et phospholipasique de l'enzyme.....	13
II.3.3. Effet de la durée d'incubation.....	13

Chapitre III : Résultats et discussion

III-1- Détermination de la teneur en protéine.....	14
III-1 -1 La teneur en protéine dans l'enzyme libre.....	14
III-1 -2- La teneur en protéine dans l'enzyme immobilisée.....	14

III-2- Immobilisation de la PLA ₁ sur le charbon actif.....	14
a-Influence du pH.....	14
b-Influence de la vitesse d'agitation.....	15
III-3-Etude de l'activité enzymatique de l'enzyme (PLA ₁).....	16
III-3-1- Etude de l'Activité lipasique de la PLA ₁ libre.....	16
a- Influence de pH.....	16
b-Influence de la température.....	17
c- Influence de la durée d'agitation.....	18
III-3-2- Etude de l'activité phospholipasique de la PLA ₁ libre.....	19
a- Effet de pH.....	19
b-Effet de la température.....	20
c- Effet de la durée d'incubation.....	21
III-3-3- Etude de l'activité lipasique de la PLA ₁ immobilisée.....	21
a-Effet de pH.....	22
b-Effet de la température.....	23
c-Effet de la durée d'agitation.....	23
III-3-4- Etude de l'activité phospholipasique de la PLA ₁ immobilisée.....	24
a- Effet de pH.....	24
b-Effet de la température.....	25
c-Effet de la durée d'agitation.....	26
III -4-Etude comparative de l'activité lipasique et phospholipasique de la PLA ₁ dans son état libre et immobilisée.....	27
III-4-1- Effet du pH.....	27

Table des matières

III-4-2- Effet de la température.....	28
Conclusion.....	30
Bibliographie	
Annexes	

Liste des figures

Figure n° 1°: Différentes étapes de raffinage de l'huile brute.....4

Figure n° 2 : Différents sites d'action de la phospholipase.....6

Figure n° 3 : La forme de micelle.....7

Figure n° 4: Pénétration de l'enzyme dans la micelle7

Figure n° 5: Hydrolyse des phospholipides en lyso-phospholipides.....8

Figure n° 6 : Effet du pH sur le rendement d'immobilisation.....13

Figure n° 7 : Effet de la vitesse d'agitation sur le rendement d'immobilisation.....14

Figure n° 8: Effet de pH sur l'activité lipasique de la PLA1 libre.....

Figure n° 9 : Effet de la température sur l'activité lipasique de la PLA1 libre.....16

Figure n° 10 : Effet de la durée d'agitation sur l'activité lipasique de la PLA1 libre..... 16

Figure n° 11 : Effet de pH sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre.....17

Figure n° 12: Effet de la température sur l'activité phospholipasique de la PLA₁ Libre....18

Figure n° 13 : Effet de la durée d'agitation sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre.....19

Figure n° 14 : Effet de pH sur l'activité lipasique de la PLA1 immobilisée.....19

Figure n° 15 : Effet de la température sur l'activité lipasique de la PLA₁ immobilisée....21

Figure n° 16: Effet de la durée d'agitation sur l'activité lipasique de l'enzyme PLA₁ immobilisée21

Figure n° 17 : Effet de pH sur l'activité phospholipasique de la PLA₁ immobilisée.....22

Figure n° 18 : Effet de la température sur l'activité phospholipasique de la PLA₁ immobilisée.....23

Figure n°19: Effet de la durée d'agitation sur l'activité phospholipasique de la PLA1 immobilisée.....	23
Figure n°20 : Effet de pH sur l'activité lipasique de la PLA1 libre et immobilisée.....	24
Figure n°21: Effet de pH sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée.....	24
Figure n°22 : Effet de la température sur l'activité lipasique de la PLA1 libre et immobilisée.....	25
Figure n° 23 : Effet de la température sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée.....	26

Liste des abréviations

BSA : Bovin Sérum albumin

PC : Phosphatidyl choline.

pH : potentiel d'Hydrogène.

PLA1 : Phospholipase A₁ .

PLA2 : Phospholipase A₂ .

PLC : Phospholipase C.

PLD : Phospholipase D .

Ppm : Partie par million.

PVA : Polyvinyllic Alcool

Spa : Société par action .

.

.

Introduction

Introduction

L'huile de soja est l'une des huiles végétales les plus abondantes dans le monde. Sa teneur relativement élevée en acides gras insaturés, sa stabilité au cours de diverses applications culinaires et des prix bas en font un élément précieux de la chaîne alimentaire et de l'alimentation humaine (**Prior, 2003**). Elle est constituée de triglycérides, vitamines phospholipides, stérols, tocophérols, acides gras libres, traces de métaux indésirables qui affectent sa qualité (goût, odeur et l'apparence) et aptitude à la conservation (**Sadeghi, 2010**).

L'élimination de ces impuretés et l'obtention d'une huile comestible nécessite le passage obligatoire par le traitement de raffinage qui comprend une série de traitements comprenant la démuçilagination, la neutralisation, le lavage, le séchage, la décoloration, la filtration et la désodorisation (**Woll, 2010**)

La première étape de raffinage qui est appelée dégomme, consiste à éliminer les phospholipides et les gommes. Elle s'effectue par l'utilisation de l'eau ou d'acide phosphorique. Une nouvelle méthode moins polluante, récemment employée dans le raffinage, utilise la phospholipase A₁. Elle est produite par *Aspergillus oryzae* provenant de la fusion des gènes de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* et gènes de la phospholipase de *Fusarium oxysporum* (**Sadeghi, 2010**).

L'instabilité des enzymes contre les variations de la température et de pH du milieu, ainsi que leur coût de production, a incité plusieurs auteurs à tester la technique d'immobilisation sur différents supports organiques ou inorganiques. Cette mise en œuvre permet aussi la réutilisation des enzymes dans les procédés industriels (**Ramachandra et al, 2002**)

Parmi les méthodes d'immobilisation on a choisi, pour des raisons techniques et de disponibilités, l'immobilisation par adsorption sur le charbon actif qui possède des propriétés absorbantes grâce à sa grande surface spécifique.

Notre travail a pour objectif d'immobiliser la Lecitase[®] Ultra utilisée au niveau de complexe Cevital sur le charbon actif et de comparer ses caractéristiques à celle d'une enzyme libre c'est-à-dire non immobilisée. Elle sera notée au cours de notre étude PLA₁ libre ou PLA₁ immobilisée.

Pour évaluer les performances de notre enzyme immobilisée et élaborer notre étude, un plan est choisi et qui se résume en une optimisation des paramètres physicochimiques les plus influents sur l'activité lipasique et phospholipasique de l'enzyme libre et immobilisée sur le charbon actif.

Synthèse
bibliographique

I-1- Le soja

Le soja, *glycine max (L) Merrill* est une plante grimpante de la famille des fabacées, du genre glycine, proche du haricot, largement cultivée pour ses graines oléagineuses qui fournissent la principale huile alimentaire consommée dans le monde. **(Rasolohery, 2007)**.

Les graines de soja constituent une excellente source de protéines de haute valeur nutritive. De plus le soja contient presque 20% en masse de lipides (phospholipides comme composants les plus importants) dans l'huile. **(Jacques, 2010)**.

I-2-Définition de l'huile de soja

L'huile de soja est un fluide de couleur jaune foncé, fraîche. Elle a une saveur assez prononcée d'haricot, c'est le contenu de la substance dure ligneuse des graines **(Cossut et al., 2002)**. Elle est polyinsaturée et très pauvre en acides gras saturés, constituée de phospholipides (2 %), tocophérols, stérols, colorants (pigments de chlorophylle et carotène), ions métalliques (Cuivre , Fer , Calcium) , Vitamines (A , D , E et K). **(Rohani, 2006)**

I-3- Le raffinage des huiles

Les huiles brutes renferment un certains nombre d'impuretés indésirables, responsables du goût désagréable et de leurs mauvaises conservations.

Le raffinage a pour but d'éliminer les acides gras libres, les produits d'oxydation, les arômes désagréables, les colorants, les produits et métaux toxiques présents à l'état de traces et les phospholipides. **(Cossut et al., 2002)**

La figure ci-dessous représente les étapes de raffinage de l'huile brute

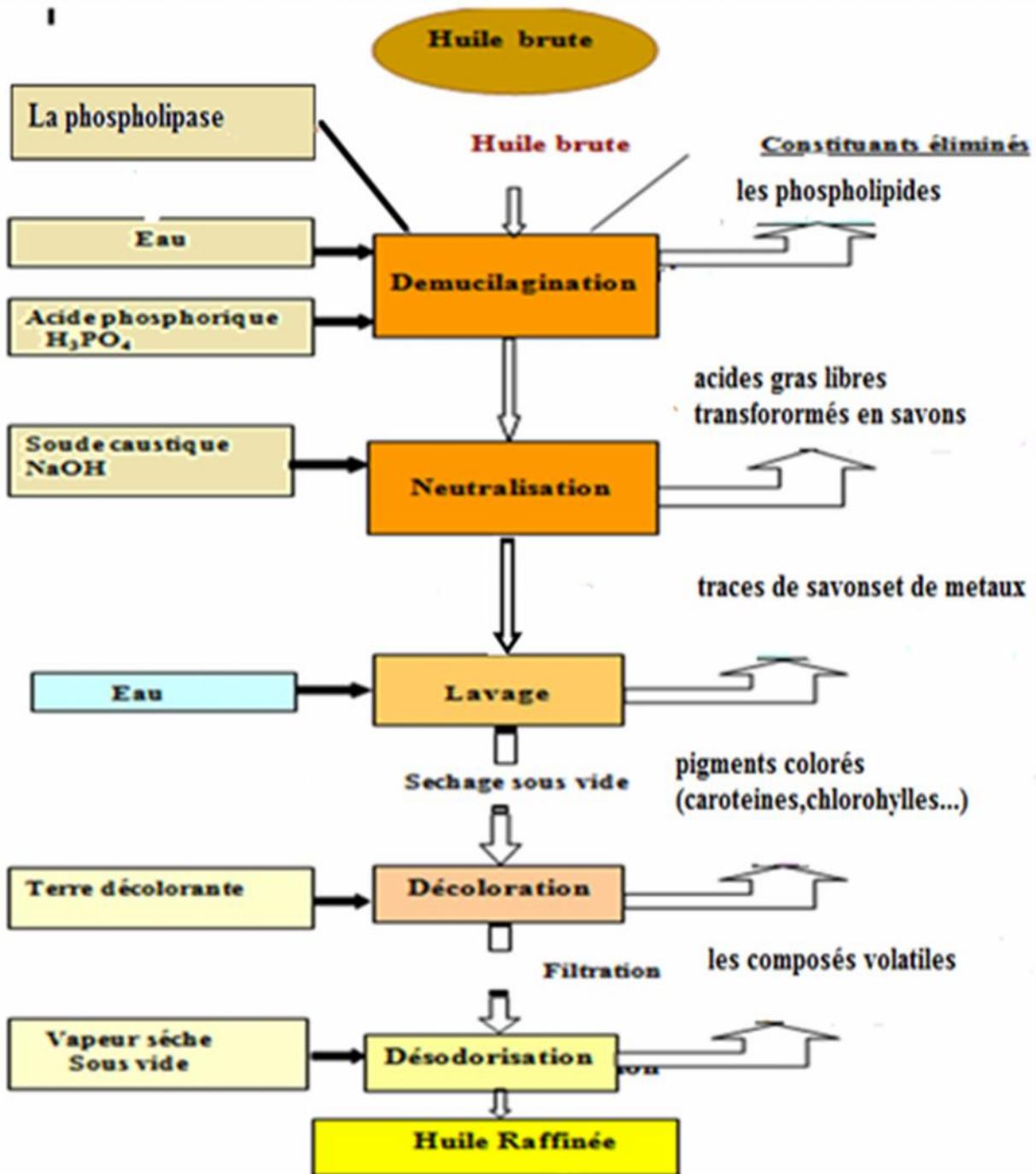


Figure 1 : Schema de raffinage de l'huile brute (Xavier, 2012)

I-4- Dégommage de l'huile brute

Ce processus est généralement considéré comme la première étape du raffinage de l'huile brute, appelée aussi démulcination. L'objectif de cette étape est de réduire la solubilité pour éliminer les phospholipides ou gommes, par utilisation d'eau, d'enzymes ou d'acides (acide phosphorique ou citrique) (**Dijkstra, 2011**).

L'intérêt de ce processus réside dans l'élimination des phospholipides présent dans l'huile, car leur présence entraîne un certain nombre d'inconvénients :

- ❖ Les composés phosphorés en présence d'eau, forment des précipités dits « Mucilages » qu'il faut absolument éliminer avant de livrer l'huile au consommateur.
- ❖ De nombreux essais ont montré qu'une huile raffinée mal débarrassée de ses phospholipides s'acidifie, s'oxyde et prend rapidement un goût désagréable. (**Xavier, 2012**).

I-4-1-Application de la phospholipase dans le dégomme de l'huile

Parmi les différentes méthodes de dégomme, une nouvelle méthode récemment employée, plus avantageuse permet de réduire le taux de phosphore à moins de 10 ppm par utilisation de la phospholipase produite par *Aspergillus oryzae* capable d'hydrolyser les phospholipides au niveau des liaisons ester. Il existe quatre types de phospholipase classées selon leur site d'action sur la molécule de phospholipide : la PLA1, la PLA2, la PLC et la PLD (**Dijkstra, 2011**).

La figure suivante représente les différents sites d'action de la phospholipase.

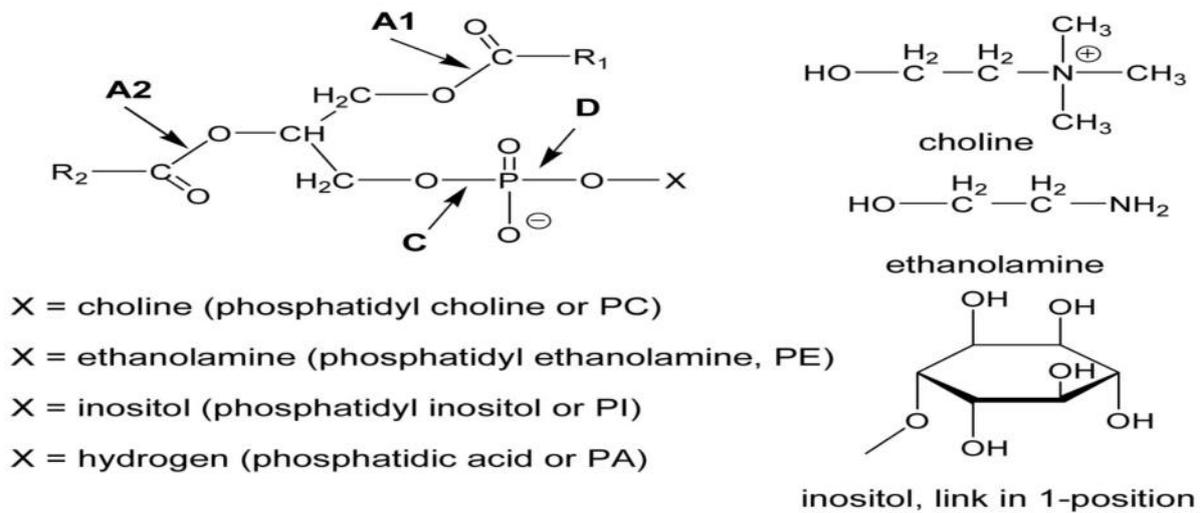


Figure 2 : Les différents sites d'action de la phospholipase. (Gregory et Terry, 2011)

I-4-2- La Phospholipase A₁ ou Lécitase Ultra

La Lécitase Ultra est une Phospholipase microbienne qui a été développée par Novozyme. 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*, ces modifications génétiques sont introduites dans le génome d'*Aspergillus oryzae*. L'enzyme est obtenue par la suite par la fermentation submergée. Elle enlève l'acide gras lié à la fonction alcool primaire du glycérol. (Yang et al., 2006 ;Dijkstra, 2011) .

Les huiles végétales contiennent une quantité importante de phospholipides hydratables sont la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) et non hydratables sont : Les acides phosphatidiques et les phosphatidylinositols. Ces phospholipides provoquent des altérations sur la qualité et le goût de l'huile .Donc il est indispensable de les éliminer par des différents traitements.

Les phospholipides hydratés sont aisément éliminés par la vapeur d'eau. ,par contre les phospholipides non hydratés nécessitent des traitements complexes par l'utilisation de la phospholipase A1 pour la conversion des phospholipides non hydratés en forme hydratés (lyso- phospholipide + la libération d'un acide gras dans la phase huileuse ce qui rend la molécule plus hydrophile facilement éliminée par centrifugation ou décantation dans la phase aqueuse. (Sadeghi, 2010) .

I-4-3-Le mode d'action de la lecitase ultra (Novozyme, 2004)

Les phospholipides dans les huiles végétales se trouvent sous forme de micelles. La présence d'une petite quantité d'eau avec une grande quantité d'ions métalliques rend les micelles dures difficiles à éliminer

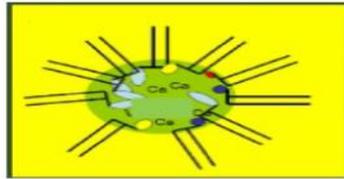


Figure 3 : La forme de micelle

L'assouplissement de la micelle est assuré par l'addition de l'acide citrique qui joue un rôle d'un agent chélateur des ions métalliques. Donc l'enzyme est capable de pénétrer dans la phase aqueuse.

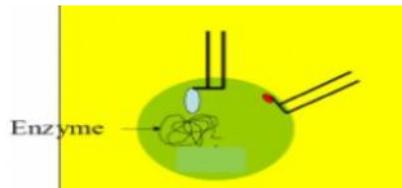


Figure 4 : Pénétration de l'enzyme dans la micelle

L'enzyme transforme la molécule de phospholipide non hydratée en forme lysophospholipide à l'interface, en libérant un acide gras dans la phase huileuse rendant aussi la molécule plus hydrophile facilement éliminée par centrifugation ou décantation dans la phase aqueuse.

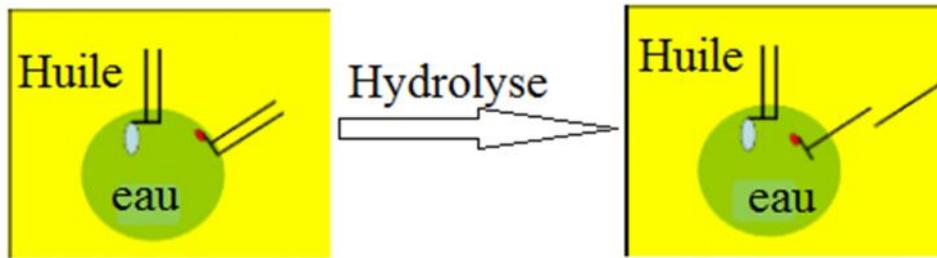


Figure 5: Hydrolyse des phospholipides en lyso-phospholipides.

I- 5-Immobilisation des enzymes

Le terme "enzymes immobilisées" se rapporte à des "enzymes localisées dans une certaine région définie de l'espace avec la conservation de leurs activités catalytiques, et qui peut être employé à plusieurs reprises et sans interruption. Les avantages des systèmes d'enzymes immobilisés comparés aux systèmes libres incluent la réutilisabilité, l'arrêt rapide des réactions, la résistance à l'environnement réactionnelle hostile, le coût abaissé, la formation contrôlée de produit, et la facilité de la séparation de l'enzyme des réactifs et des produits. (Akoh et Min, 2002)

I-5-1- Techniques d'immobilisation

Il existe de nombreuses méthodes d'immobilisation telles que : (Stéphanie, 2006)

- Immobilisation par adsorption.
- Immobilisation par des liaisons ioniques.
- Immobilisation par inclusion.
- Immobilisation par encapsulation.

I-5-2-Principe de l'immobilisation par adsorption

C'est la méthode la plus simple et rapide basée sur les forces hydrophobes entre l'enzyme et la matière de support organique (Polymères phénoliques, résine échangeuse d'ions) ou inorganique (charbon actif, argile, silice). L'avantage de cette méthode est l'absence de changement chimique sur le support ou sur l'enzyme.

C'est une méthode dans laquelle la protéine enzymatique est liée à la surface d'un support par des interactions de type hydrophobe, de Van der Waals. Un support est ajouté à la solution enzymatique et après agitation le système enzyme-support est prêt à être utilisée.

I-5-3-Application de charbon actif comme support d'immobilisation des enzymes

a. Le Charbon actif (CA)

Le charbon actif est un matériau poreux couramment utilisé dans de nombreuses applications domestiques et industrielles, dépollution des effluents domestiques, purification ou décoloration de produits agroalimentaires. Il est produit à partir de précurseurs hydrogénéocarbonés comme par exemple le bois et la noix de coco. C'est un matériau contenant un fort pourcentage de carbone (Ayrat, 2009)

Le charbon actif subit une activation qui s'effectue par deux méthodes ; chimique et physique

- **Méthode chimique :**

Elle consiste à mettre en contact la matière broyée avec les agents activateurs tels que l'acide phosphorique (H_3PO_4), la potasse (KOH) et le chlorure de zinc ($ZnCl_2$). (Cagnon, 2002).

- **Méthode Physique :**

Elle se déroule en deux étapes ; la première est une carbonisation de la matière première à haute température, la deuxième est une oxydation de carbonisation par la vapeur d'eau ou par le dioxyde de carbone (Ayrat, 2009).

Matériel
et
méthodes

• **II.1 Matériel**

II.1.1 Enzyme

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

Tableau I : Propriétés de la Lecitase[®]Ultra (source Novozymes A/S, 2007)

Forme physique	Liquide
Couleur	Brune
Microorganisme producteur	<i>Aspergillus oryzae</i>
Microorganisme donneur	<i>Thermomyces Lanuginosus</i>
Température de stockage	0 - 10 °C

II.1.2 Support pour l'immobilisation

Le support utilisé dans cette étude pour l'immobilisation de la PLA₁ est le charbon actif, commercialisé par Biochem Chemopharma. Le support a été utilisé sans aucun traitement préalable au laboratoire.

II.1.3 Autres produits et réactifs chimiques utilisés

- Les solutions de substrats employées pour évaluer l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme (Lecitase[®] Ultra) ont été préparées respectivement à partir de la lécithine (Cevital spa) et l'huile d'olive pure.
- L'alcool polyvinylique (PVA) de marque Biochem Chemopharma a été employé comme agent tensioactif dans la préparation des solutions de substrats.
- Le Sérum Albumine Bovin (BSA) et l'acide phosphorique et la soude (NaOH) sont de qualité Recta Pures (Cheminova).
- L'éthanol et le bleu de Coomassie G250 sont de marque Fluka.
- Le tampon utilisé dans cette étude a été préparé avec l'acide citrique et hydrogénât phosphate di-sodique (Na₂HPO₄).

II.2 Méthodes

II.2.1 Méthodes analytiques

a- Dosage des protéines

La teneur en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (**Bradford, 1976**) en utilisant la BSA comme étalon et le bleu de Coomassie G250 comme réactif coloré. Le dosage des protéines est déterminé par spectrophotométrie (UV mini-1240, SHIMADZU) à une longueur d'onde de 595 nm et la teneur en protéines a été déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage (Annexe 1).

b- Teneur en protéine dans la préparation enzymatique immobilisée

La teneur en protéine dans le support P_A a été déterminée par la relation suivante :

$$P_A = P_0 - P_f \quad (1)$$

Où P_f la quantité des protéines présente dans le surnageant et P_0 = la quantité de protéine de l'enzyme libre égale à 17,4 mg/ml.

c- Calcul du rendement

Afin d'étudier les conditions optimales pour l'immobilisation de l'enzyme sur le support de charbon, des expériences ont été menées pour déterminer le pH et la vitesse d'agitation optimale de l'immobilisation de l'enzyme. A la fin de chaque expérience, le filtrat est récupéré et est soumis au dosage des protéines.

Le rendement d'immobilisation est ensuite déterminé par la formule (2), où P_A est la quantité de protéine enzymatique dans le support et P_0 est la teneur en protéine de l'enzyme brute. Les résultats sont illustrés dans la figure 1 et la figure 2.

$$\text{Rendement d'immobilisation (\%)} = \frac{P_A}{P_0} \cdot 100 \quad (2)$$

II.2.2 préparation des solutions tampons

Les solutions tampon d'acide citrique pH (4 - 8) ont été préparées à partir de l'acide citrique (0.1 M) et Na_2HPO_4 (0.2 M) suivant le Protocole recommandé par (**Dean, 1999**).

II.2.3 Immobilisation de la PLA₁ : Protocole expérimental

La PLA₁ a été mélangée avec la solution tampon d'acide citrique à un rapport volumique 1:5. L'immobilisation par adsorption sur le charbon actif a été réalisée en ajoutant au support la solution enzymatique selon un rapport volume (ml)/masse (g) de 5:0,5. La suspension ainsi obtenue est maintenue sous agitation fixe à température ambiante pendant 30 min. A la fin de cette période, le charbon actif a été récupéré par une simple filtration pour le soumettre à l'analyse spectrophotométrique des protéines (P_f) dans le visible à la longueur d'onde maximale de 595 nm.

II.2.4 Détermination de l'activité de l'enzyme libre

a- Activité lipasique

L'activité lipasique a été déterminée par la méthode titrimétrique comme décrite par Yang et al (2006). La solution substrat consiste en un mélange d'alcool polyvinylique à 4% et de l'huile d'olive pure à un rapport 1:4. La réaction enzymatique est initiée après l'ajout de la solution enzymatique. Après incubation, la réaction est arrêtée par l'ajout de 10 ml d'éthanol. Les acides gras libérés sont titrés par une solution de NaOH (0.05 N). L'activité lipasique est exprimée en unité lipasique et définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mole d'acides gras libres titrables par minute dans les conditions standards. Les valeurs de l'activité sont rapportées en activité relative obtenue par la relation (3):

$$\text{Activité relative} = \frac{\text{L'activité enzymatique}}{\text{L'activité enzymatique maximal}} \cdot 100 \quad (3)$$

b- Activité phospholipasique

L'activité phospholipasique a été déterminée selon la méthode de l'activité lipasique, mais en utilisant une émulsion de lécithine comme solution substrat. Celle-ci a été préparée en mélangeant à un rapport volumique 1 :4, une solution de lécithine de soja à 10 % et de l'alcool polyvinylique 4 %. Le mélange a été agité à vitesse constante 2000 tr/min pendant 10 min.

II.2.5 Détermination de l'activité de l'enzyme immobilisée

L'activité lipasique et phospholipasique de la PLA₁ immobilisée a été déterminée selon le même protocole décrit précédemment pour l'enzyme libre. La seule différence est que 0.5 g de charbon actif contenant l'enzyme est ajouté au mélange réactionnel.

II.3. Caractérisation de la PLA1 libre et immobilisée

Les propriétés de la PLA1 immobilisée produite en section II.2.3 et de l'enzyme libre sont étudiées pour déterminer les différences éventuelles entre l'enzyme dans son état libre et immobilisée. Les propriétés étudiées comprennent le pH, la température et la durée d'incubation.

II.3.1 Effet de pH sur l'activité lipasique et phospholipasique de l'enzyme

Le pH a un effet considérable sur l'activité des enzymes par le fait que les substrats et les sites actifs des enzymes portent souvent des groupes fonctionnels acides ou basiques dont l'ionisation varie avec le pH, comme rapporté par les travaux de la littérature (Anh, 2002). Afin de déterminer si l'immobilisation a un effet sur le pH optimum de l'enzyme, le profil de pH de l'enzyme libre doit être déterminé, de sorte qu'il puisse être comparé à celui de l'enzyme immobilisée. Toutes les différences entre les valeurs de pH de l'enzyme libre et immobilisée peuvent indiquer quel sont les modifications apportées par l'immobilisation.

L'effet du pH sur l'activité lipasique et phospholipasique de la PAL1 libre a été mesuré dans la solution tampon d'acide citrique (0.05) M, à différentes valeurs de pH (4- 8).

II.3.2. Effet de la température sur l'activité lipasique et phospholipasique de l'enzyme

Comme pour le cas du pH, l'effet de la température sur l'activité des enzymes a été rapporté par les travaux de la littérature (Anh, 2002). Dans notre cas, l'étude de l'effet de la température sur l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme libre et immobilisée a été déterminée dans un intervalle de température entre 30 et 80 °C.

II.3.3. Effet de la durée d'incubation

Pour étudier l'effet de la durée d'incubation sur l'activité lipasique et phospholipasique de l'enzyme libre et immobilisée, des durées d'incubations de 5, 10, 15, 20 et 25 minutes ont été utilisées.

Résultats
et
discussion

III.1. Détermination de la teneur en protéine

III.1 .1 La teneur en protéine dans l'enzyme libre

La teneur en protéine p_0 présente dans 1ml d'enzyme libre a été déterminée par l'utilisation de la courbe d'étalonnage illustrée dans l'annexe I. L'analyse a donné une valeur de P_0 de 17,4 mg/ml.

III.2. Immobilisation de la PLA1 sur le charbon actif

a- Influence du pH

L'étude de l'influence du pH a été choisie sur un intervalle de 4 à 8. Les mesures de quantités de protéine dans le surnageant nous ont permis de déduire P_A et de calculer les rendements en appliquant l'équation 1 (voir chapitre II). Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 6.

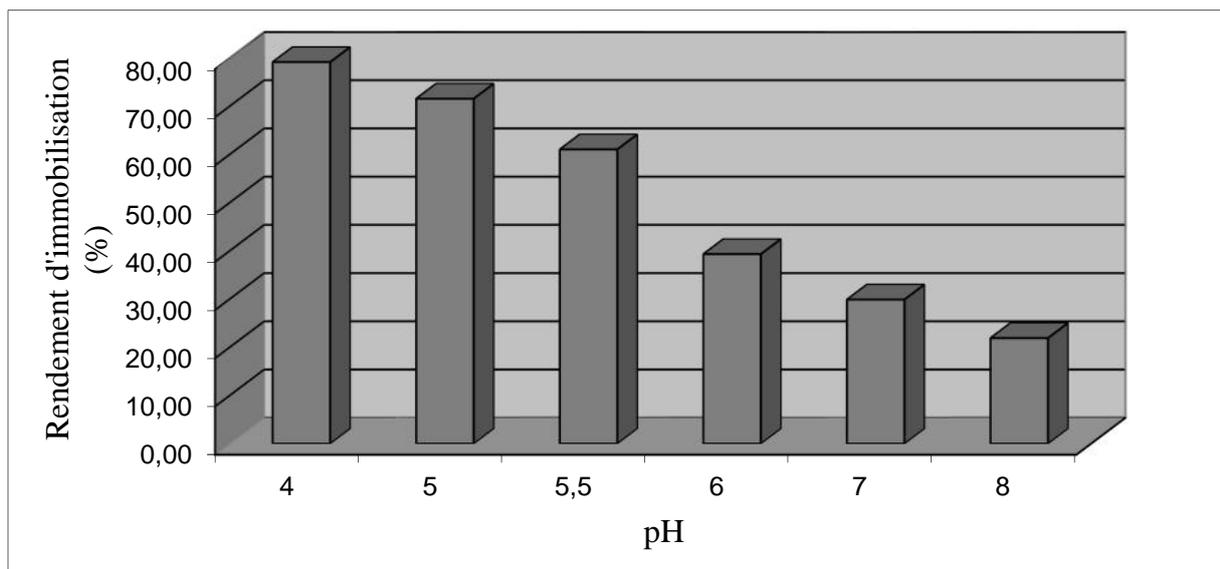


Figure 6 : Effet du pH sur le rendement d'immobilisation

La figure 6 reprend les résultats de l'effet du pH sur l'immobilisation de l'enzyme par le support. La teneur en protéine de l'enzyme déterminée par la méthode de Bradford est de 17.4 mg/ml. Les résultats de la figure 6 montrent que 80 % de rendement d'immobilisation est atteint avec un pH de 4. Donc le milieu acide favorise l'adsorption de l'enzyme sur le support. En revanche seulement 21 % à pH 8 (basique).

b-Influence de la vitesse d'agitation

L'étude de l'influence de la vitesse d'agitation a été choisie dans un intervalle de 200 à 1000 rpm . Les mesures de quantités de protéine dans le surnageant nous ont permis de déduire P_A puis de calculer les rendements en appliquant l'équation 2 (voir Chapitre II). Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 7.

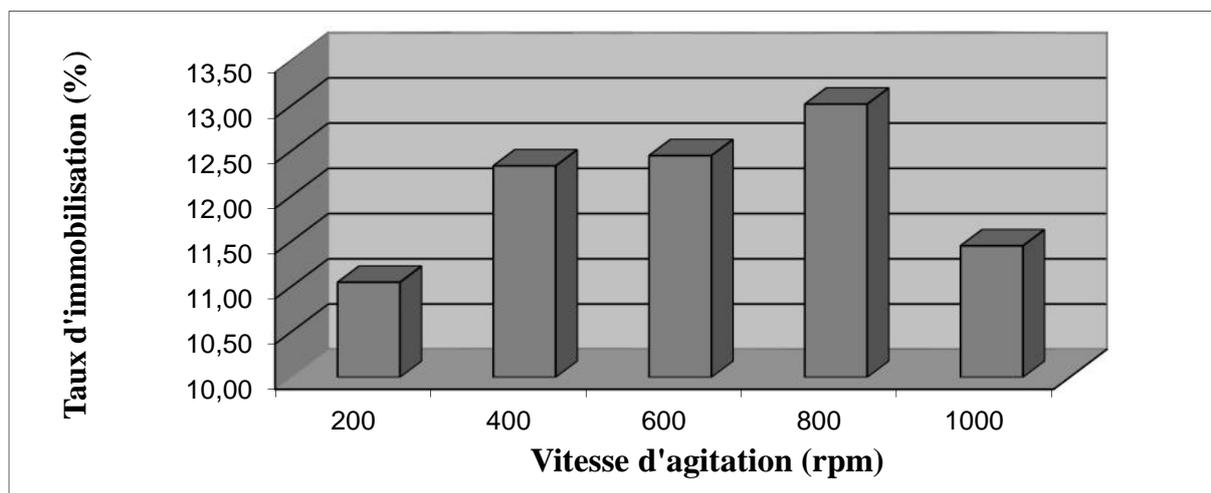


Figure 7 : Effet de la vitesse d'agitation sur le rendement d'immobilisation

Les résultats de la figure7 représentent le rendement d'immobilisation en fonction de la vitesse d'agitation. Les essais ont été menés à pH 4 à la température ambiante. On observe sur le tracé de ces graphiques une augmentation de la vitesse d'agitation qui atteint un maximum à 800 rpm pour diminuer au-delà de cette vitesse d'agitation. En effet, le faible rendement d'immobilisation est obtenu aux faibles (200 rpm) et grandes valeur de vitesses d'agitation (1000 rpm). En outre, à l'intérieur de ces deux limites, c'est à dire à 400, à 600 et à 800 rpm,. À faible vitesse d'agitation, on peut formuler qu'il y aurait probablement un mauvais contact entre le support et l'enzyme. Ainsi d'ailleurs pour le cas de grande vitesse d'agitation, les turbulences et les forces centrifuge rendent le phénomène d'adsorption de l'enzyme sur le support antinomique. Ce qui favorise la désorption et pourrait éventuellement expliquer le faible rendement enregistré à ces vitesses d'agitations.

III.3. Etude de l'activité enzymatique de l'enzyme (PLA₁)

III.3.1. Etude de l'activité lipasique de la PLA₁ libre

L'effet de pH et de la température a été étudié et l'activité lipasique de l'enzyme a été mesurée en utilisant la méthode décrite par Yang et *al* (2006). Avec l'huile d'olive pure comme substrat.

a. Influence de pH

La variation de l'activité lipasique de la PLA₁ libre en fonction de pH est représentée dans la figure 8.

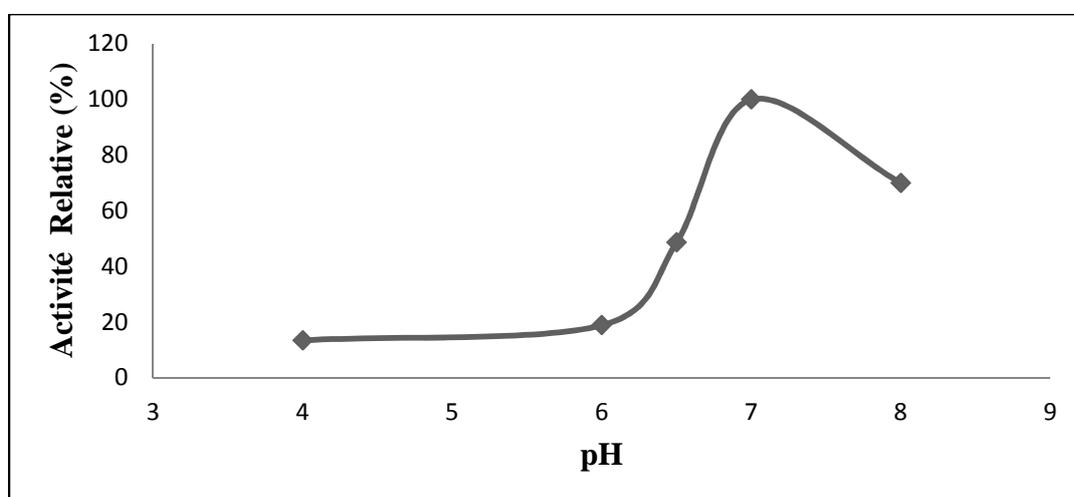


Figure 8: Effet de pH sur l'activité lipasique de la PLA₁ libre. Conditions expérimentales : Température : 50°C. ; Durée d'incubation= 15 min, 100% =185U.

Les résultats de la figure 8 montrent que le pH neutre a un effet prononcé sur l'activité de la PLA₁ libre. En effet, l'activité de l'enzyme est faible à valeurs du pH acide. En revanche, l'enzyme a exprimé une activité la plus élevée à pH 7, ensuite elle perd de nouveau son activité à pH alcalin.

Les travaux de Sheelu et collaborateurs en 2008 ont observés que la PLA₁ sous sa forme libre montre un profil de grand activité à pH entre 6,5 et 8,5. D'autres auteurs (Mishra et *al.*, 2009) ont rapportés un pH-optimum de 8,5.

b. Influence de la température

L'effet de la température sur l'activité lipasique de l'enzyme libre est illustré dans la figure 9.

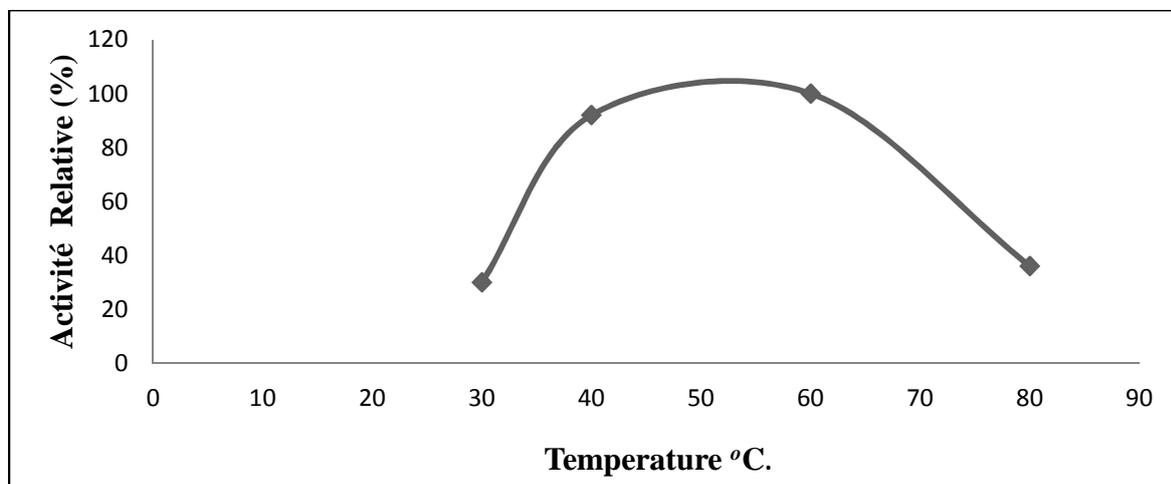


Figure 9: Effet de la température sur l'activité lipasique de la PLA1 libre. Conditions expérimentales: pH : 7 ; durée d'incubation : 15 min ; 100% = 125U.

L'allure de la figure 9 représentant l'activité de la PLA1 en fonction de la température est différente de celle de l'effet du pH. Par ailleurs cette allure adopte parfaitement une courbe de type gaussienne. L'activité a une allure ascendante entre 30 et 40 °C jusqu'à atteindre sa valeur la plus élevée à 60°C, ensuite, elle prend une tendance descendante pour atteindre sa valeur la plus faible à 80 °C. Des résultats similaires ont été reportés par (Yu et al., 2013) et (Yu et al., 2012).

c. Influence de la durée d'agitation

La variation de l'activité lipasique de la PLA1 en fonction de la durée d'agitation est présentée dans la figure 10 suivante :

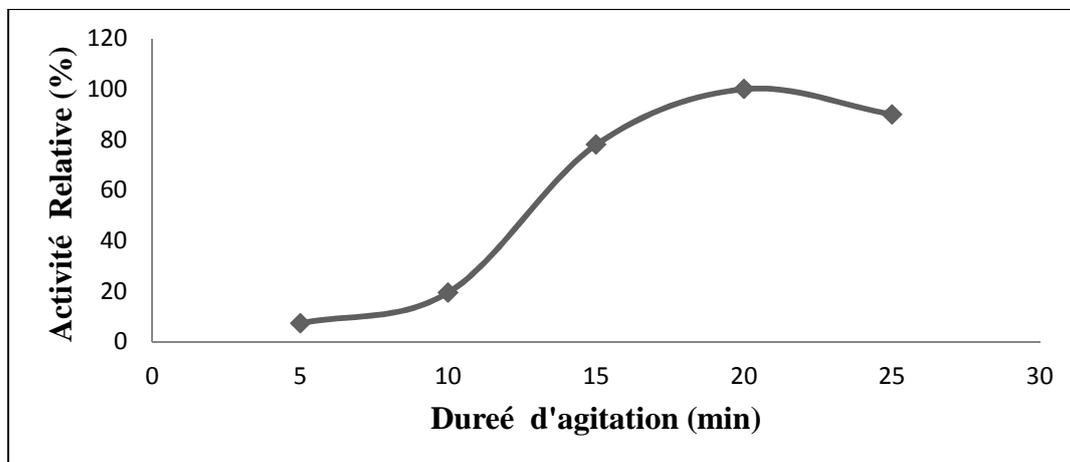


Figure 10. Effet de la durée d'agitation sur l'activité lipasique de la PLA₁ libre.

Conditions expérimentales : pH: 7 ; température : 60°C ; 100% : 205 U.

La figure 10 montre que l'activité lipasique augmente avec l'augmentation de la durée d'incubation, ou elle atteint le maximum après 20 min d'incubation. Des résultats similaires ont été rapportés par (Yang et al., 2006). Au delà de cette durée, elle a une tendance à se stabiliser. Un prolongement de la durée d'agitation a pour rôle une homogénéisation de la répartition des molécules de substrat dans la suspension afin d'assurer un accès complet du substrat au site actif de l'enzyme.

III.3.2. Etude de l'activité phospholipasique de la PLA₁ libre

a. Effet de pH

L'effet de pH sur l'activité phospholipasique de la PLA₁ libre est illustré par la figure 11.

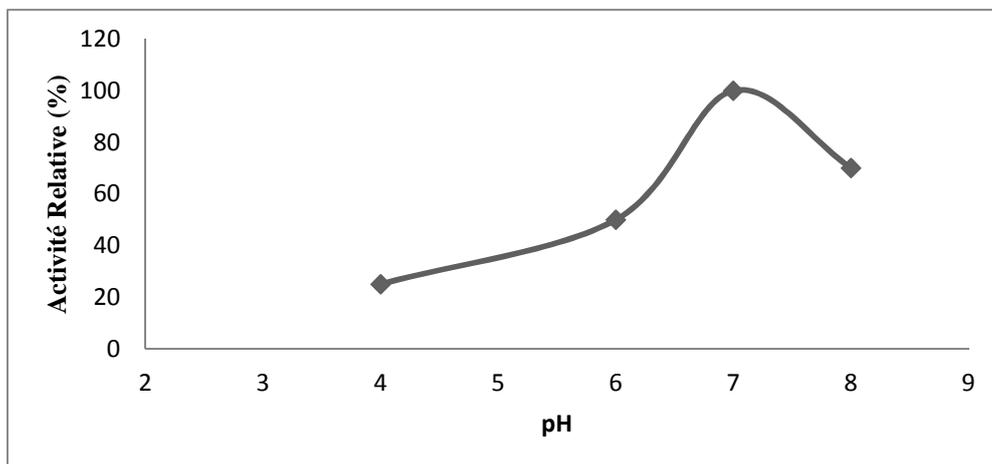


Figure 11 : Effet de pH sur l'activité phospholipasique de la PLA₁ libre. Conditions expérimentales : Température : 50°C ; durée d'agitation : 15min ; 100% = 40 U.

On observe dans la figure 11 que l'activité phospholipasique de l'enzyme est faible à valeurs de pH acide. En revanche, l'enzyme exprime une activité plus élevée à pH 7 (neutre), ensuite elle perd de nouveau son activité à valeurs de pH alcalin. Donc, on retient que la valeur du pH optimal est de 7. Les travaux de la littérature rapportés par (**Wang et al.,2008**) ont montré que la meilleure valeur du pH dans le cas de l'hydrolyse de l'huile de soja par la phospholipase A₁ est de 6,8. Ce résultat corrobore avec notre résultat.

b-Effet de la température

L'influence de la température sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre est illustrée par la figure 12.

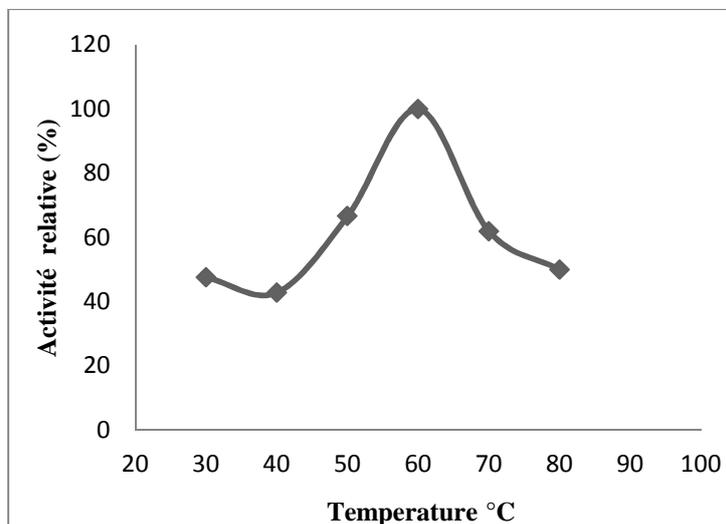


Figure 12: Effet de la température sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre
Conditions expérimentales: pH: 7 ; durée d'agitation: 15 min ; 100%= 105 U.

L'allure de la figure 12 qui reprend l'activité phospholipasique de la PLA1 libre en fonction de la température est similaire à celle de l'activité lipasique, elle adopte une courbe de type gaussienne. L'activité montre une tendance ascendante entre 40 et 50 °C jusqu'à atteindre une valeur maximale à 60 °C, ensuite elle décroît au-delà de cette valeur à 70 et 80°C.

c. Effet de la durée d'incubation

L'effet de la durée d'incubation sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre est représenté par la figure 13.

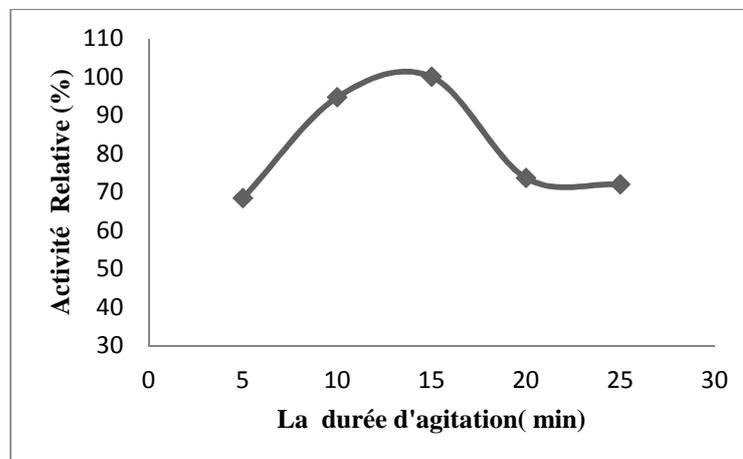


Figure 13 : Effet de la durée d'agitation sur l'activité phospholipasique de la PLA₁ libre. Conditions expérimentales : pH : 7 ; température : 60°C ; 100% = 95 U.

La figure 13, qui représente l'effet de la durée d'agitation sur l'activité phospholipasique de l'enzyme libre, montre que l'activité augmente avec l'augmentation de la durée d'agitation. Elle atteint un maximum de 95 U après 15 minutes d'incubation. Au delà de cette valeur, elle diminue progressivement. On constate que l'effet de la durée d'incubation n'a pas identique pour les deux activités. En effet, l'enzyme qui exprime une activité phospholipasique la plus élevée à 15 min, lui faudra 20 min pour exprimer son activité lipasique la plus élevée. Ce résultat confirme que la PLA1 a plus d'affinité aux phospholipides comme substrat qu'aux triglycérides.

III.3.3. Etude de l'activité lipasique de la PLA1 immobilisée

a- Effet du pH

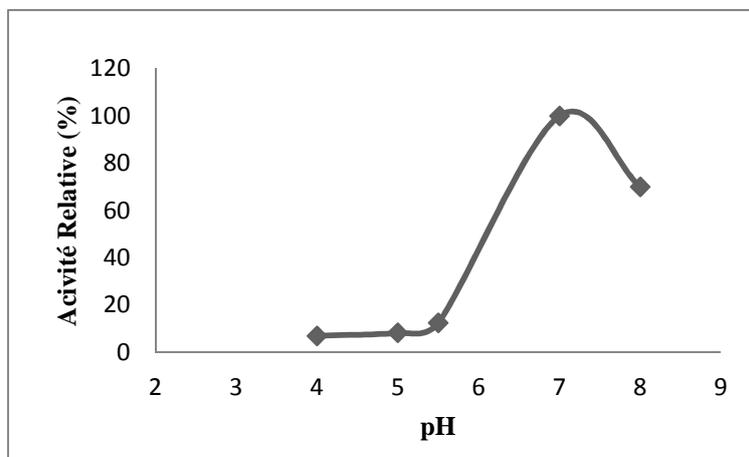


Figure 14 : Effet de pH sur l'activité lipasique de la PLA1 immobilisée. Conditions expérimentales : Température : 50 °C ; durée d'agitation : 15 min ; 100% : 60 U .

L'influence du pH sur l'activité lipasique de la PLA 1 immobilisée sur le charbon actif est représentée sur la figure 14. Dans la gamme du pH entre 4 et 6, aucune variation significative n'est observée. Dans ce domaine l'enzyme exprime ces plus faible valeur en terme d'activité. En revanche, l'activité de l'enzyme croit jusqu'à pH 7, qui est sa valeur la plus élevée. Dans les régions de pH alcalin, l'enzyme perd son activité. Ces résultats indique que le pH optimal de la PLA₁ immobilisée est de 7.

Par ailleurs, le fournisseur de l'enzyme recommande d'utiliser la PLA₁ à pH acide, valeur maintenue en vigueur dans le procédé de dégomme au niveau de la raffinerie Cevital. Ceci trouve son explication ; que les opérateurs utilise l'acide citrique pendant le dégomme des huiles végétales afin de chélater les métaux d'un côté, et de l'autre pour créer un milieu acide favorable à l'enzyme. Paradoxalement à cela, cette technique exige l'utilisation d'une grande quantité de soude afin d'ajuster le pH. La soude ajoutée en excès peut réagir avec les TAG pour former des savons et ainsi diminuer le rendement de l'huile. Ce qui nécessite aussi l'addition d'une étape de séparation des savons formés de l'huile et augmente le coût de la purification de l'huile.

b- Effet de la température

L'influence de la température sur l'activité lipasique de l'enzyme immobilisée est représentée dans la figure ci-dessous

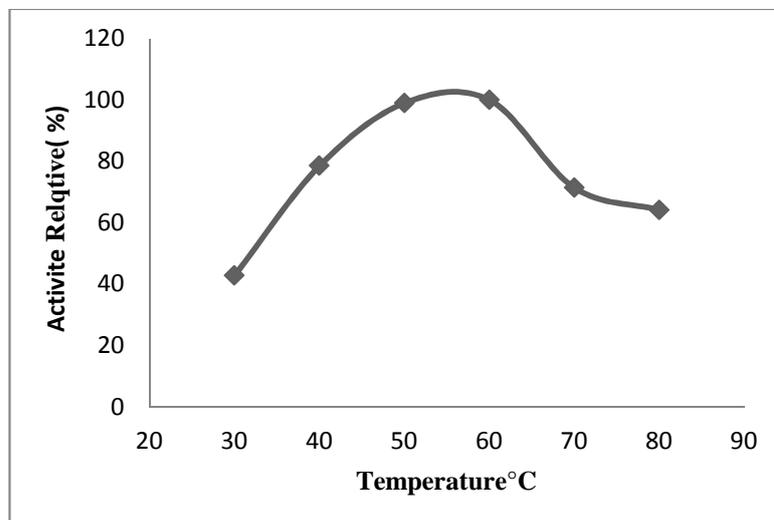


Figure 15 : Effet de la température sur l'activité lipasique de la PLA₁ immobilisée. Conditions expérimentales : pH : 7 ; durée d'agitation : 15 min ; 100% : 70 U.

Comme pour l'enzyme dans son état libre, l'activité lipasique de la PLA₁ immobilisée a une allure ascendante entre 30 et 50 °C jusqu'à atteindre sa valeur maximale à 60 °C, ensuite, elle prend une tendance descendante pour atteindre une valeur la plus faible à 80 °C.

c. Effet de la durée d'agitation

L'influence de la durée d'agitation sur l'activité lipasique de la PLA₁ immobilisée est illustrée dans la figure 16.

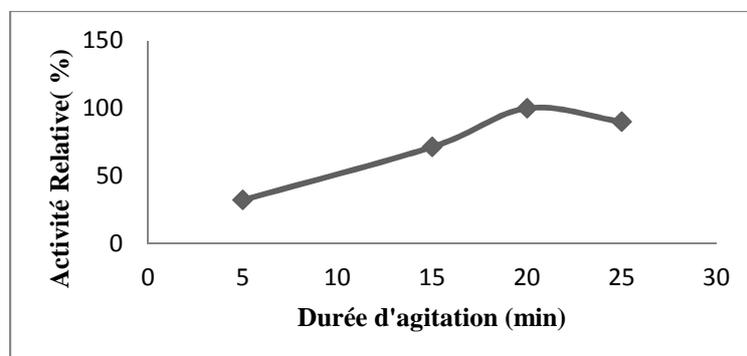


Figure 16: Effet de la durée d'agitation sur l'activité lipasique de l'enzyme PLA₁ immobilisée. Conditions expérimentales : pH : 7 ; température : 60° C ; 100% : 70 U.

On observe sur les résultats de la figure 16 que l'activité lipasique de la PLA₁ immobilisée a une allure ascendante entre 5 et 20 min d'incubation, au-delà elle diminue. Nous constatons que la durée d'incubation a le même effet sur l'activité lipasique de la PLA₁ libre et immobilisée.

III.3.4. Etude de l'activité phospholipasique de la PLA₁ immobilisée

a. Effet du pH

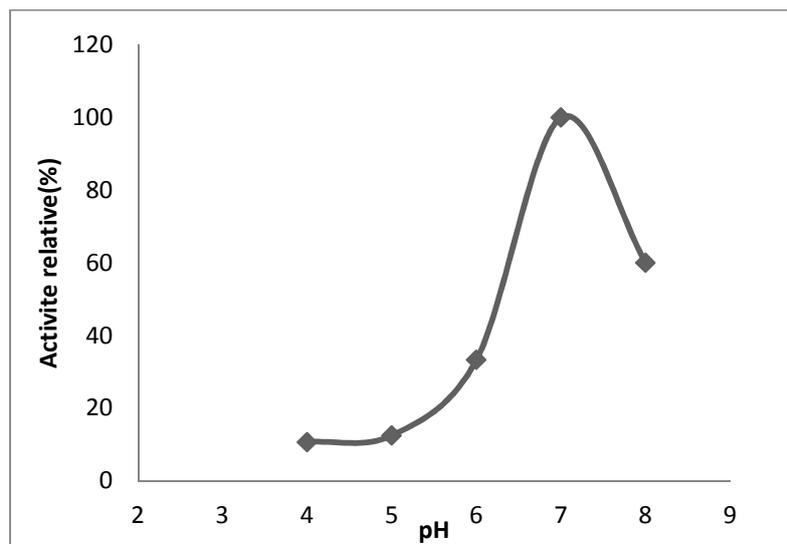


Figure 17 : Effet du pH sur l'activité phospholipasique de la PLA immobilisée. Conditions expérimentales : Température : 60°C ; durée d'agitation : 15min ; 100% : 30U.

L'activité phospholipasique augmente avec l'augmentation du pH et atteint un maximum à pH 7. Cependant, elle diminue aux pH alcalins. On peut stipuler que l'enzyme est hautement active à pH neutre. De plus, cette observation dans le comportement de l'enzyme (allure identique) traduit le même phénomène que pour l'activité lipasique de la lipase immobilisée, vis-à-vis du pH.

b. Effet de la température

L'influence de la température sur l'activité phospholipasique de la PLA₁ immobilisée est représentée dans la 18.

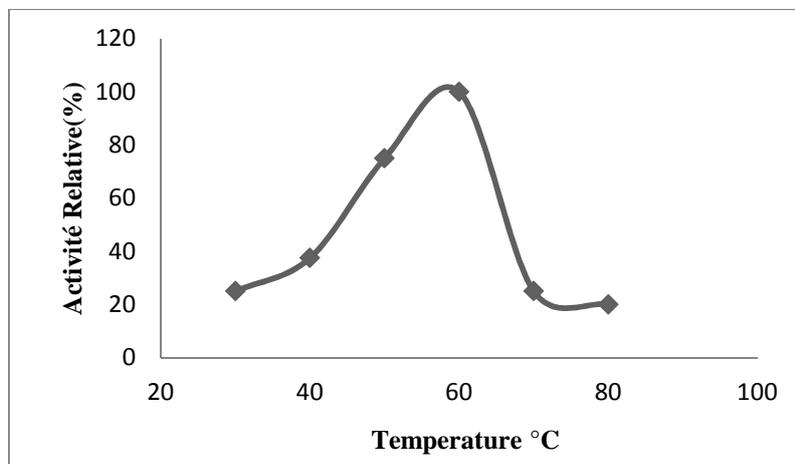


Figure 18 : Effet de la température sur l'activité phospholipasique de la PLA₁ immobilisée. Conditions expérimentales : p H :7 ;durée d'agitation : 15min ; 100% : 40 U.

D'après les résultats obtenus, l'activité phospholipasique de la PLA₁ immobilisée a une allure ascendante entre 30 et 50 °C et exprime sa valeur maximale à 60 °C. Ensuite elle prend une tendance descendante pour atteindre une valeur la plus basse à 80 °C. On pourrait dire que l'enzyme est hautement active à 60°C. Des résultats similaires sont rapportés par certains auteurs (**Dianyu, 2012**)

c. Effet de la durée d'agitation

La variation de l'activité phospholipasique de PLA₁ immobilisée en fonction de la durée d'agitation est représentée dans la figure 19

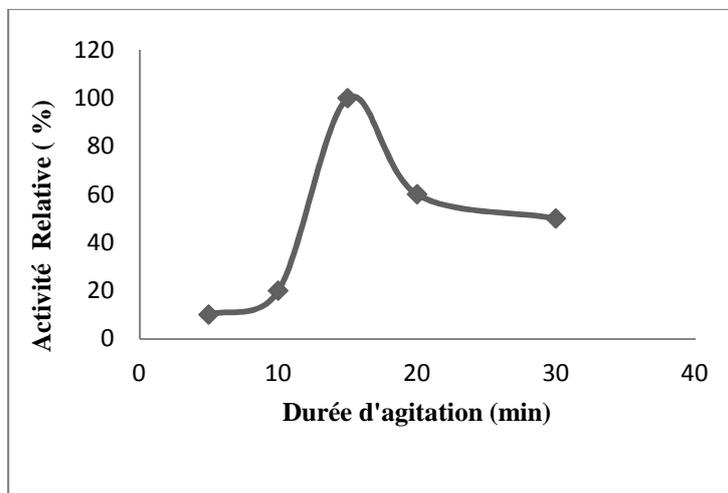


Figure 19 : Effet de la durée d'agitation sur l'activité phospholipasique de la PLA₁ immobilisée. Conditions expérimentales : pH : 7 ; température : 60°C; 100% : 50 U.

La figure 19 montre que la croissance de l'activité phospholipasique de l'enzyme immobilisée est proportionnelle à l'augmentation de temps d'incubation. Elle atteint un maximum après 15 minutes, puis elle diminue. De plus, la durée d'incubation a le même effet sur l'activité phospholipasique exprimée par la PLA₁ libre et immobilisée.

III .4. Etude comparative de l'activité lipasique et phospholipasique de la PLA1 dans son état libre et immobilisée.

III.4.1. Effet du pH.

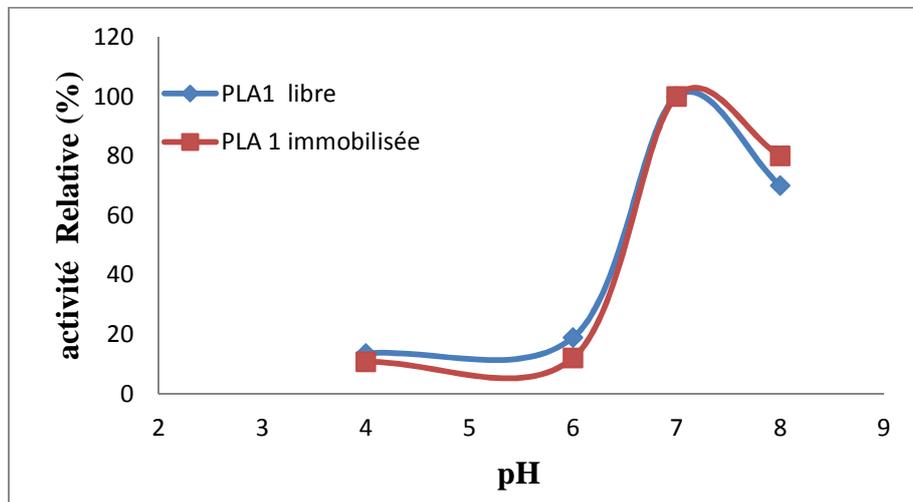


Figure20 : Effet de pH sur l'activité lipasique de la PLA1 libre et immobilisée.

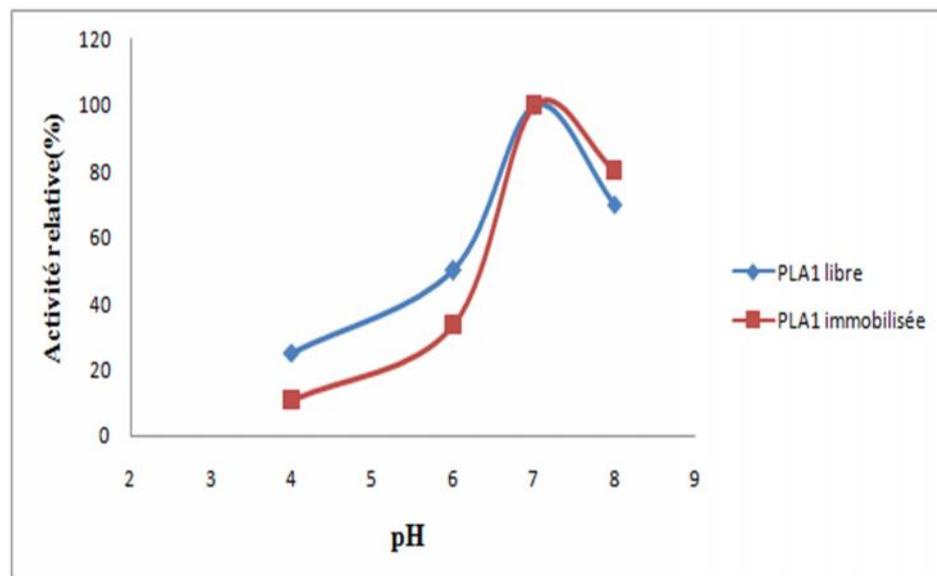


Figure 20 : Effet de pH sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée.

Il est connu que L'activité enzymatique dépend strictement de sa structure moléculaire et compte sur l'existence d'une structure appropriée de son site actif (**Whitehurst, 2010**). Par conséquent, les conditions défavorables de température, du pH... etc provoquent la perte de la fonction de l'enzyme.

Le facteur du pH peut d'une part, régir la distribution des charges autour du site actif et dans la molécule de protéine toute entière, d'autre part, le pH influe sur l'état d'ionisation des résidus avec les groupes acides et basiques des chaînes latérales (Tuan Mai, 2002).

A partir des résultats obtenus concernant l'activité lipasique et phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée, on constate que l'immobilisation n'a pas un effet significatif sur le pH optimal de l'enzyme. On peut supposer que cela est dû aux faibles liaisons entre l'enzyme et le support. En termes d'activité lipasique, l'enzyme dans son état libre montre une activité de 185U à pH 7. Dans les mêmes conditions, elle manifeste une activité de 60U dans le cas immobilisée sur le support.

Concernant l'activité phospholipasique de la phospholipase A1, elle prend une valeur de 40U à l'état libre et de 30U à l'état immobilisée dans les mêmes conditions de pH 7. Donc, il est évident que la PLA1 exprime une activité plus élevée à l'état libre.

III.4.2. Effet de la température

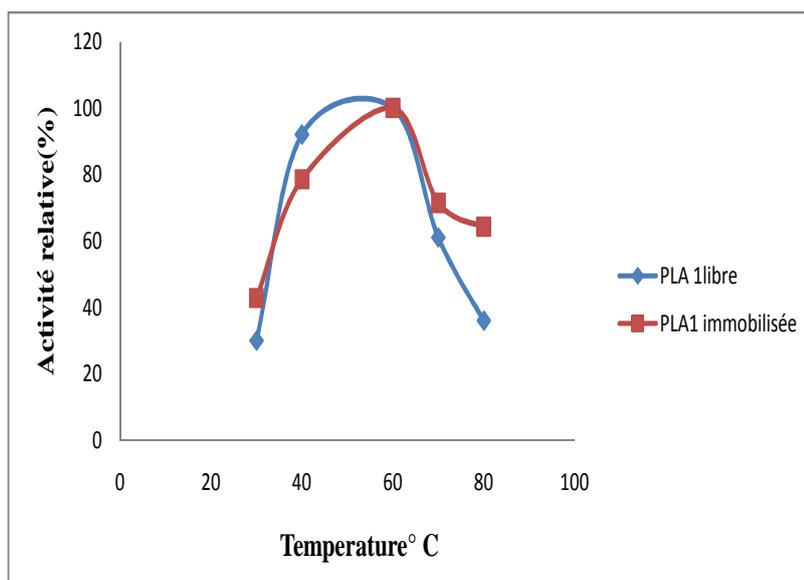


Figure 21 : Effet de la température sur l'activité lipasique de la PLA1 libre et immobilisée.

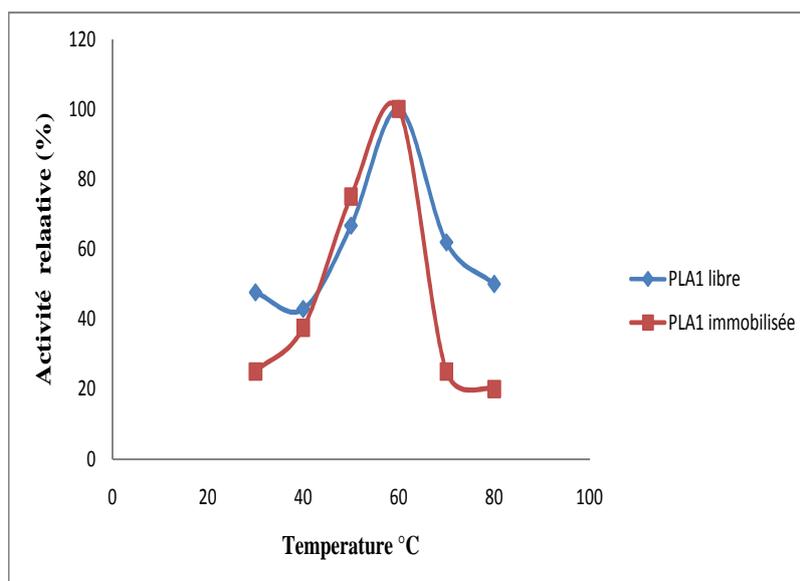


Figure 22 : Effet de la température sur l'activité phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée.

Comme pour le pH, la température peut affecter l'activité enzymatique. En effet la vitesse de la réaction chimique augmente avec la température en raison de l'énergie cinétique fournie aux molécules qui favorise le nombre de collisions efficacement en conduisant aux produits de réaction. Mais l'activation par la température d'une réaction enzymatique s'accompagne toujours du phénomène de dénaturation des liaisons intra et intermoléculaires au-delà de la température optimale (Fabiano, 2002).

A partir des résultats obtenus concernant l'activité lipasique et phospholipasique de la PLA1 libre et immobilisée, on constate que l'immobilisation n'a pas un effet significatif sur la température optimale de l'enzyme pour assurer sa stabilité. En termes d'activité lipasique, l'enzyme dans son état libre montre une activité de 125 U à pH 7. Dans les mêmes conditions, elle manifeste une activité de 70 U dans le cas immobilisée sur le support.

Concernant l'activité phospholipasique de la phospholipase A1, elle prend une valeur de 105 U à l'état libre et de 40 U à l'état immobilisée dans les mêmes conditions de pH 7. Donc, il est évident que la PLA1 exprime une activité plus élevée à l'état libre. Ainsi, l'activité lipasique domine l'activité phospholipasique.

Conclusion

Conclusion

Au cours de l'élaboration de ce mémoire, on a étudié le phénomène d'immobilisation d'une phospholipase A1 sur le charbon actif par la détermination de l'activité phospholipasique et lipasique de l'enzyme. L'objectif principal est la détermination des paramètres optimums de l'enzyme libre et immobilisée.

Les résultats de l'étude de l'immobilisation de l'enzyme sur le charbon actif ont montré que le taux d'immobilisation est meilleur à pH 4 et à une vitesse d'agitation de 800 rpm.

L'étude des paramètres physico-chimiques (pH et température) de l'enzyme libre et immobilisée nous a montré que l'immobilisation même si l'activité lipasique et phospholipasique diminuent par rapport à l'enzyme libre, n'a pas d'effet sur le pH optimum de l'enzyme qui est de 7 et sur la température optimal de l'enzyme qui est de 60°C.

Un résultat important pour nous a été mis en évidence. En effet, l'activité lipasique de la PLA1 prédomine toujours sur l'activité phospholipasique.

En perspectives, notre étude reste préliminaire et le thème reste ouvert pour de prochaines études, nous suggérons :

- ✓ Effet de la température sur l'immobilisation.
- ✓ Influence de la durée d'agitation sur l'immobilisation.
- ✓ Application de la phospholipase A₁ immobilisée dans le dégommeage de l'huile de soja.
- ✓ Influence de la concentration de la solution enzymatique sur l'activité lipasique et phospholipasique de la phospholipase A₁.

Références

bibliographiques

A

- Akoh C et Min D.(2002). Food lipids chemistry, Nutrition and Biochemistry. 2nd Edition. Dekker.418p.
- Dijkstra A J. (2011). Feature enzymatic degumming. Lipid Technology. **2**, 1-2
- Ayral C. (2009). Elimination de polluants aromatiques par oxydation catalytique sur charbon actif. Thèse de Doctorat. Université d'Orléans. Faculté des Sciences et Technologies, 152 P.
- Anh TM. (2002). Développement des biocapteurs électrochimiques à base de tyrosinase pour la détection des polluants organiques en phase aqueuse .Thèse de Doctorat. Université de Claude Bernard, Lyon I, p30.

B

- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. **72**, 248-254.

C

- Cagnon B. (2002) . Elaboration de charbon actif à texture contrôlée. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences et Technologies, Université de Perpignan, 166 P.
- Cossut J, Defrenne B, Desmedt C, Ferroul S, Garnet S, Roelstraete L, Vanuxeem M et Vidal D. (2002) . Les Corps Gras: Entre tradition et modernité. Gestion de la Qualité Nutritionnelle et Marketing des Produits Alimentaires. 2nd Edition . pp35-40.

D

- Dianyu Y, Ying M, Sophia J X, Lianzhou J , Shi J. (2013). Characterization of immobilized phospholipase A₁ on magnetic nanoparticles for oil degumming application, LWT-Food Sci Technol. **50**, 519- 525 .
- Dean J. A. (1999). Lange's Handbook of Chemistry. Mc Graw-Hill, Inc.

F

- Fabiano S. (2002). Immobilisation d'enzymes dans des films de polymère conducteur. Application à la réalisation de biocapteurs ampérométriques pour le dosage du glucose et des composés phénoliques. Thèse de Doctorat en Chimie-Biochimie. Université Claude Bernard, Lyon I, 161p.

G

- Gregory S R et Terry K S. (2011). Phospholipase A₁. Int J of Mol Sci. **12**, 588-589.

M

- Mishra MK, Kumaraguru T, Sheelu G, Fadnavis NW .(2009). Lipase activity of lecithase ultra: characterization and applications in enantioselective reactions. Tetrahedron: Asymmetry. **20**,2854–2860.

N

- Novozyme A/S Denmark. (2004). Enzymatic degumming processes. <http://www.novozymes.com/enzymes4oils-fats> . Consulted Mai 2014

P

- Prior E. (2003). Usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. Lipides et Corps Gras Alimentaires. Ed. Tec et doc. Lavoisier , pp.157-187.

R

- Ramachandra M, Jayadev B, Muniswaran P K A. (2002). Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme. Biotechnol Bio Process Eng. **7**. 57-66.
- Rasolohery C. (2007). Etude des variations de la teneur en isoflavones et de leur composition dans le germe et le cotylédon de la graine de soja [Glycine max (L.) Merrill]. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse. Faculté des Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, 13p.
- Rohani BMZ. (2006). Process design in degumming and bleaching of palm oil. Centre of Lipids Engineering and Applied Research. 4-9.

S

- Sadeghi M . (2010). Purification of soybean oil with phospholipase A₁. *Theor and Exp Chem.* **2**, 132-133.
- Stéphanie Vial. (2006) . Immobilisation d'Enzymes dans des hydroxydes doubles Lamellaires. Réalisation de Biocapteurs pour la détection de polluants organiques, Thèse de Doctorat. Université BLAISE PASCAL. Ecole Doctorale des Sciences Fondamentales, pp 24-32.
- Sheelu G, KavithaG, Fadnavis NW .(2008) . Efficient immobilization of lecithase in gelatin hydrogel and degumming of rice bran oil using a spinning basket reactor. *JAOCS* . **85**, 739–748.

W

- Whitehurst R, Oort M . (2010). *Enzymes in Food Technology* 2nd Ed. Wiley-Blackwell.
- Wang Y, Zhao M, S, Song K. (2008). Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase. *J. Food Lipids.* **16**,113–132.
- Woll J P. (1968). *Manuel d'analyse des corps gras*. Edition Azoulay

X

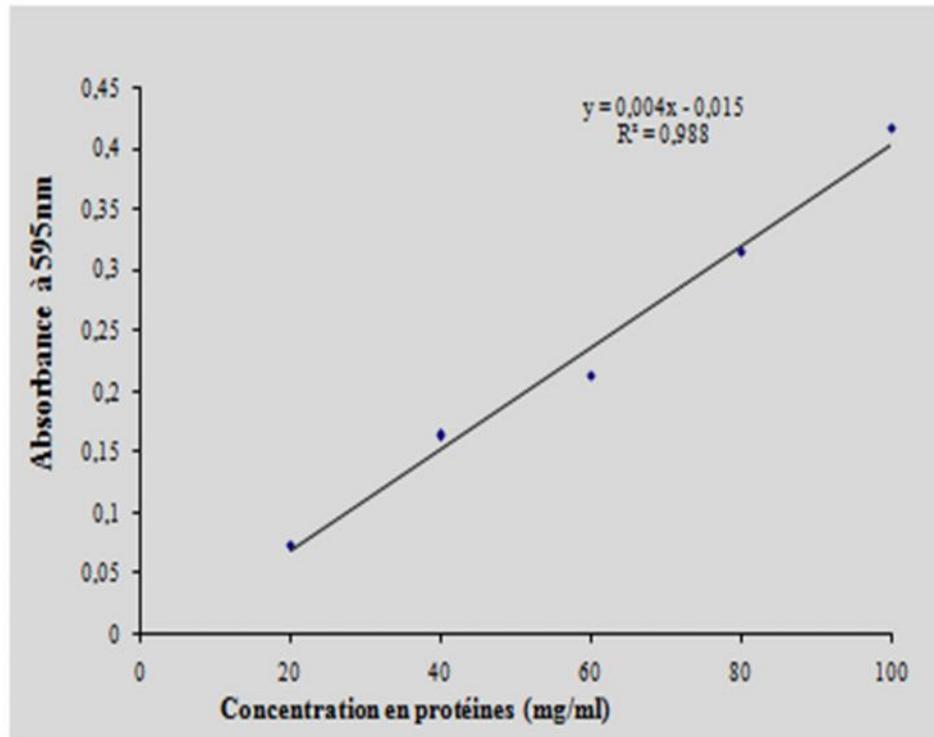
- Xavier PAGÈS-XATART-PARÈS. (2012). *Technologies des Corps Gras (huiles et graisses végétales)*. Dossier Techniques de l'Ingénieur l'expertise technique et scientifique de référence.

Y

- Yang J et *al.* (2006), Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase. *Food Technol and Biotechnol.* **44**, 101-104.
- Yu D, Jiangl, Li Z. (2012) .Immobilization of phospholipase A1 and its application in soybean oil degumming. *J am oil chem soc.* **89**, 649–656.

Annexes

Annexe 1 : La courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines.



Résumé :

Le présent travail a fait l'objet de l'immobilisation d'une enzyme libre la phospholipase A1 (Lecitase Ultra) dérivée de *Aspergillus oryzae*, sur un support organique de charbon actif commercial. L'étude porte sur la détermination des paramètres optimums de pH et de température.

Les résultats obtenus ont montré que le pH et la température optimums sont respectivement de 7 et 60°C qui demeurent invariable après une immobilisation de l'enzyme. En outre, la PLA1 présente une meilleure activité lipasique en présence d'huile d'olive que phospholipasique en présence de la lécithine de soja comme substrat.

Mots clés : PLA1, activité lipasique, activité phospholipasique, immobilisation, charbon actif.

Summary

The present work has been the capital of a free enzyme phospholipase A1 (Lecitase Ultra) derived from *Aspergillus oryzae*, on an organic support commercial activated carbon. The study focuses on determining the optimum parameters of pH and temperature.

The results obtained showed that the optimum pH and the temperature are respectively 7 and 60 ° C that remains invariable after immobilization of the enzyme. Furthermore, the present improved PLA1 lipase activity in the presence of olive oil as the phospholipase in the presence of soy lecithin as substrate.

Keywords: PLA1, lipase activity, phospholipase activity, immobilization, active carbon