

50376
1975
37

N° d'ordre : 526

50376
1975
37

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

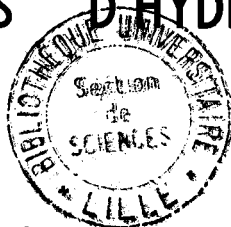
DOCTEUR DE 3^e CYCLE

Spécialité : BIOCHIMIE

par

Gilbert DUFLOT

**RECHERCHES SUR LE POUVOIR TENSIO-ACTIF
DE QUELQUES PROTEIDES
VIS-A-VIS D'HYDROCARBURES**



Présenté le 3 Mai 1975, devant la COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury :	M. J. MONTREUIL	Président
	Melle G. SPIK	Rapporteur
	M. M. PORCHET	Examineur



D 030 172024 2

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORS,
DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERRET, KOUGANOFF,
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. L'HOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET,
MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DECUYPER Marcel	Géométrie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LEBRUN André	Electronique

M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique Atomique et Moléculaire
Mle MARQUET Simone	Probabilités
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. COULON Jean	Electrotechnique
Mlle DACCHARI Monique	Géographie
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DRIEUX Baudouin	Informatique
M. DUEE Gérard	Géologie Appliquée
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. FROELICH Daniel	Chimie Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUIGOU Jean-Louis	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mlle KOSMANN Yvette	Géométrie
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique

1. SOMME Jean
1. SPIK Geneviève
1. STANKIEWICZ François
1. THERY Pierre
1. TOULOTTE Jean-Marc
1. TREANTON Jean-René
1. VANDORPE Bernard
1. VILLETTE Michel
1. WATERLOT Michel
1. WERNIER Georges
1. YVON Jean-Pierre
me ZINN-JUSTIN Nicole

Géographie
Biochimie
Sciences Economiques
Electronique
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Mécanique
Géologie Générale
Informatique
Analyse Numérique
Algèbre

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de
Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques
de LILLE I, sous la direction de Mademoiselle Geneviève SPIK,
Maître de conférences et de Monsieur Jean MONTREUIL, Professeur.

"

D'une façon générale, la pollution des mers se présente comme d'autant plus dommageable que, de plus en plus, eu égard à l'accroissement sans frein de la population humaine, on songe à exploiter largement les ressources nutritives que peuvent fournir les océans.

Il est évident que ceux-ci ne peuvent jouer, tout ensemble, les rôles de garde manger et de poubelle. "

Jean ROSTAND . 1968

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	
GENERALITES	1
TRAVAUX PERSONNELS	14
- <u>Démonstration de la nature protéidique des facteurs émulsionnant les hydrocarbures présents dans les mélasse</u>	14
1 - Séparation des constituants des mélasse.	
Composition chimique des fractions obtenues	14
2 - Localisation de la substance tensio active des mélasse	26
3 - Vérification de l'activité tensio active des protéides de mélasse	34
- <u>Mécanisme d'action des protéides</u>	40
1 - Mise en évidence du mécanisme d'action	40
2 - Discussion	48
3 - Conclusion	52
- <u>Contributions à l'amélioration du pouvoir tensio actif des protéines pour l'émulsion des hydrocarbures dans l'eau</u>	53
1 - Recherche d'un agent liant favorisant l'activité de la caséine	54
2 - Essai d'un nouveau substrat émulsionnant l'oeuf total	62
3 - Etude du pouvoir tensio actif du jaune d'oeuf.	
Propriétés particulières des lipoprotéines	66
- <u>Méthodologie</u>	76
- <u>Synthèse et perspectives</u>	
BIBLIOGRAPHIE	

INTRODUCTION

Le 19 Mars 1967, le "Torrey Canyon" s'échouait près des Iles Seven Stones, et déversait près de 100.000 tonnes de pétrole brut à l'entrée de la Manche. Le plan ORSEC fut déclenché, mais en vain, car très vite la pollution s'étendit sur près de 400 kilomètres de côtes, des plages de Cornouaille à la Bretagne.

Par cet accident, l'Europe était pour la première fois, confrontée avec une grave pollution des mers par les hydrocarbures, et l'opinion publique définitivement sensibilisée.

Devant l'urgence du problème, les organismes responsables utilisèrent nombre de dispersants afin de fractionner les hydrocarbures en microgouttelettes et accélérer leur biodégradation.

Ces agents chimiques provoquèrent malheureusement des dommages hydrobiologiques et écologiques importants sur les zones côtières beaucoup plus néfastes que ceux provoqués par le pétrole lui-même. Telles furent les principales conclusions du Laboratoire d'Hydrobiologie de Plymouth qui suivit ces pulvérisations massives.

Depuis cette époque, les techniques concernant ces produits de synthèse ont évolué. Certains solvants toxiques ont été abandonnés.

Sur le plan français, un nouveau diluant a été proposé : composé essentiellement de saccharose et d'acide phosphorique, il permettrait de réaliser une émulsion stable avec les hydrocarbures et l'eau, et stimulerait en outre la croissance des bactéries destinées à attaquer le pétrole.

Il pourrait être fabriqué à partir des mélasses résiduelles des raffineries de sucre.

C'est SALOMONE (1) qui a suggéré pour la première fois l'existence du pouvoir tensio-actif de ces mélasses sucrières. Sollicités par la firme DANBROS qui a commercialisé le produit sous le nom de SEFOIL, nous nous sommes attachés, dans un premier temps, à améliorer le procédé, à isoler et à identifier la substance tensio-active des mélasses.

Nos travaux nous ont permis de démontrer que les protéides des mélasses étaient des agents actifs et que les protéides en général, la caséine en particulier, donnaient des résultats identiques.

Nous avons poursuivi ces travaux dans le but de comprendre le mécanisme d'action des protéines et de proposer une structure d'agent émulsifiant beaucoup mieux adaptée à la dispersion et à la biodégradation des hydrocarbures.

Avant de décrire les résultats de nos travaux, nous résumerons de façon très générale les moyens d'action actuellement mis en vigueur pour combattre la pollution des eaux marines par les produits pétroliers.



GENERALITES

Parler pollution des mers, pour l'opinion publique, c'est bien souvent faire le procès des hydrocarbures, tant il est vrai que le pétrole fournit la manifestation la plus spectaculaire de cette forme de pollution.

I . Différents types de pollution marine par les hydrocarbures.

La contamination des mers par les hydrocarbures possède deux origines différentes :

- 1° - La pollution peut être accidentelle et provenir de sinistres affectant les transports de pétroles bruts et de produits finis, ou d'accidents dus à l'exploitation des plate-formes de forage.
- 2° - La pollution peut être chronique et être provoquée par les rejets des pétroliers après nettoyage de leurs citernes, des pertes subies au cours de chargement, de la condensation des vapeurs d'hydrocarbures rejetées dans les effluents gazeux.

La pollution accidentelle est spectaculaire. La pollution chronique est plus insidieuse et plus dangereuse, car les tonnages qu'elle met en jeu sont beaucoup plus importants que ceux qui sont déversés lors d'accidents de pétroliers.

Lorsque le pétrole échappe au contrôle de l'homme, son accumulation en un point du globe provoque automatiquement une série de mécanismes qui perturbent l'équilibre écologique local.

2 . Mécanismes de la pollution marine par les Hydrocarbures.

1° - Lorsque le pétrole est répandu sur la mer, au contact de l'air et à la température ambiante, les hydrocarbures gazeux en solution s'évaporent les premiers, suivis par les fractions liquides les plus légères qui sont douées d'une forte tension de vapeur (essences, naphthènes).

Aussi ce qui était à l'origine un fluide très mobile, s'épaissit progressivement et devient une pâte visqueuse et noirâtre. Ce résidu s'émulsionne par mélange avec 80 % d'eau de mer et cette nappe flottante dérive au gré des courants.

Dans la zone qu'elle traverse , tout ce qui flotte se trouve englué ; plancton, poissons et oiseaux de mer.

2° - Ballotée par la mer, cette matière polluante est attaquée lentement par des bactéries aérobies qui l'amincissent, la fragmentent et provoquent son immersion.

Parvenus sur les fonds marins et incorporés aux boues, les résidus sont soumis alors à l'action des bactéries anaérobies qui les transforment en acide carbonique et en eau.

C'est SOHNGEN (cité par GATELLIER) (2), qui, au début du siècle, a signalé l'existence de ces organismes susceptibles de métaboliser les hydrocarbures.

.../

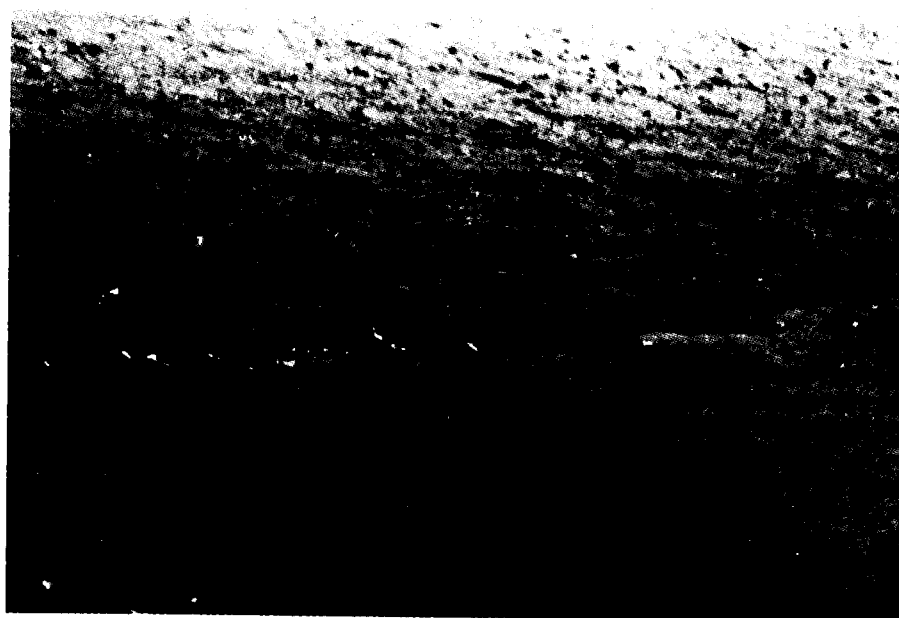


Figure n° 1

Nappe d'hydrocarbures lors de la marée

montante en Bretagne (doc. omya) .



Figure n° 2

Albatros englué, paralysé, asphyxié

par la marée noire.

Les processus biochimiques aboutissant à la dernière phase sont encore très mal connus. On sait cependant qu'au cours de la dégradation des corps toxiques très divers sont formés : acides organiques - alcools - aldéhydes et cétones, qui sont repris par une chaîne alimentaire aboutissant à des animaux consommés par l'homme.

3° - Si ces plaques émulsionnées parviennent jusqu'au rivage, la frange supérieure du benthos et tout le biotope côtier dans la zone polluée se trouvent détruits par asphyxie des larves aquatiques ou par arrêt de la photosynthèse. Il faut alors plusieurs années pour voir se réinstaller les espèces disparues.

3 . Techniques et Moyens divers de lutte

contre les Hydrocarbures.

On peut envisager le problème de l'élimination du pétrole répandu sur la mer de différentes manières, chacune des techniques utilisant une caractéristique différente du matériel en question. Cependant comme la facilité de récupération du pétrole sera d'autant plus grande que l'épaisseur de la nappe sera plus importante, il apparaît nécessaire avant toute chose de circonscrire l'étalement du pétrole à la surface de l'eau.

DEGOBERT (3) s'est livré à une étude bibliographique critique très détaillée de tous les divers procédés mécaniques ou physiques de traitement des nappes, en les considérant dans l'ordre de leur intervention après un accident.

1° - Limitation de l'étalement des hydrocarbures.

a) Par gélification des nappes.

Ce procédé peut être utilisé selon deux méthodes. Soit on gélifie sur place le pétrole susceptible de se répandre, soit on réalise, par gélification, des barrières chimiques à la périphérie de la nappe en expansion. Cette seconde méthode consiste par exemple à créer une pellicule, en pulvérisant, autour de la nappe, une solution aqueuse de borax et d'alcool polyvinyle qui précipite sous forme de "peau" au contact de l'eau salée.

.../

b) Par rétraction des nappes.

SIGWALT (4) montre qu'il est possible de limiter l'extension de la nappe de pétrole, par addition à sa périphérie d'acides gras saturés qui neutraliseront les forces d'étalement et provoqueront la rétraction de la nappe.

D'après GARRETT - BARGER (5), d'autres composés sont susceptibles de remplir le même rôle comme le sorbitol, glycérol ou des polyoxyéthylène alkyl éthers.

c) Par confinement des nappes.

On peut encore s'opposer à la dérive des nappes en utilisant des barrières mécaniques

α) Barrières physiques ou barrages.

Ce sont des barrières flottantes, composées de vessies gonflables ou de matériaux comme la mousse de plastique. Sous les flotteurs, se trouve une jupe importante par laquelle sont attachés le ballast et l'ancrage.

MILZ (6) montre que ces barrières peuvent être flexibles, semi-flexibles ou rigides.

Ce type de barrière, pour être efficace, doit présenter au minimum une surélévation de 20 % et un tirant d'eau de 80 % de l'épaisseur totale de la nappe. Bien souvent, ces barrières se révèlent inefficaces dans des conditions difficiles de haute mer, de plus elles présentent l'inconvénient de s'opposer à la navigation.

β) Barrières pneumatiques à bulles d'air.

DEGOBERT (7) décrit ce type de barrière comme un mur vertical de bulles d'air envoyé à partir d'un tube perforé reposant sur le fond ou flottant entre deux eaux. Ce barrage présente donc l'avantage sur les barrières physiques de n'avoir pas à résister mécaniquement à l'action des vagues, du vent et des courants. En outre il ne

.../

s'oppose pas physiquement au passage des navires et des poissons.

L'énergie nécessaire à ce type de barrage est un facteur limitant au développement de ces barrières pneumatiques. Si le débit d'air injecté est insuffisant par rapport à la vitesse du courant, la barrière de bulles a tendance à s'infléchir vers l'aval, et le pétrole peut s'infiltrer dessous dans le mouvement tourbillonnaire ainsi créé et franchir le barrage.

2° - Récupération des Hydrocarbures.

a) Par aspiration.

Le ramassage du pétrole par aspiration se fait généralement à l'aide d'une crépine conçue pour aspirer le mélange pétrole et eau sans créer aucune émulsion des deux phases et faciliter ensuite la décantation sur le navire de réception.

Ce moyen de reprise du pétrole flottant fut expérimenté avec succès par la Marine Nationale : environ 1 200 tonnes furent pompées à bord du caboteur " Petrobourg".

Un système à ferrofluide est à l'étude actuellement pour augmenter la capacité de pompage du pétrole. Ce procédé consisterait à solubiliser dans l'hydrocarbure déversé de très fines particules ferromagnétiques fortement polarisables et rendues oléophiles par une couche d'acide oléique qui servirait dans le même temps d'antifloculant (BERTRAND) (8). L'hydrocarbure rendu sensible à l'action d'un champ magnétique, pourrait être alors collecté aisément dans l'entrefer d'un dispositif récupérateur, et récupéré par pompage classique.

Cette méthode offre cependant des risques écologiques non négligeables.

.../

Un autre procédé de récupération du pétrole, est la formation d'un effet Vortex sous l'action des pales d'une hélice placée au fond d'un cylindre vertical qui évacue en permanence l'eau entraînée. Le pétrole se collecte dans le Vortex axial d'où il peut être aspiré et récupéré par pompe.

b) Par absorption.

La technique consiste à mettre en contact avec la nappe de pétrole, des blocs absorbant qui seront récupérés, essorés ou détruits. Les substances absorbantes les plus utilisées sont des polymères non mouillables par l'eau ; polyuréthanes et polystyrènes en particulier.

Le polystyrène expansé rendu plus oléophile peut absorber par exemple jusqu'à 100 fois son poids de pétrole.

Des dispositifs en continus ont été proposés, avec emploi de tambours recouverts de matériau absorbant qui s'imbiberaient de pétrole et seraient essorés ensuite par des rouleaux.

La récupération mécanique du pétrole déversé est une méthode très intéressante, mais elle ne permet de reprendre qu'une partie de la cargaison. Aussi doit-on lui associer une autre technique qui éliminera les hydrocarbures résiduels

3° - Elimination des hydrocarbures résiduels.

a) Par combustion.

Brûler le pétrole sur l'eau pose des problèmes car l'hydrocarbure en émulsion avec l'eau de mer forme une "mousse au chocolat" très difficile à brûler. En outre, au bout de quelques heures le pétrole

.../

brut est froid, ses composés volatils se sont évaporés et il est alors trop modifié pour émettre en quantités suffisantes des vapeurs inflammables.

Au lieu de brûler directement l'huile, il est préférable de l'absorber avec des billes de verre poreuses qui sont ensuite brûlées, la chaleur de combustion dans le verre favorisant la vaporisation de l'hydrocarbure et son inflammation. Il faut cependant noter qu'il subsiste toujours 15 à 20 % de produits non brûlés.

b) Par précipitation.

Dans les milieux français, on préconise l'utilisation d'une couche ultrafine de craie de champagne traitée en surface par un corps gras qui la rend hydrophobe. Cette poudre qui flotte sur l'eau coule dès qu'elle est en présence d'hydrocarbures, en formant avec ceux-ci un mastic très stable.

Ce procédé a été appliqué au large d'Ouessant où plus de 20.000 tonnes de pétrole furent coulées. Cette méthode est certes intéressante mais il faut prendre, d'une part, en considération la position des lieux de pêche, d'autre part, la solution des problèmes n'est certainement pas atteinte une fois que l'on a envoyé par le fond les hydrocarbures, car leur dégradation se fait alors lentement. En outre, il y a toujours une contamination possible des poissons en cas de résurgence ; c'est prendre un risque énorme que de couler du pétrole, car en cas de rupture des congglomérats, les hydrocarbures libérés viennent modifier encore plus profondément les équilibres écologiques déjà trop fragiles, que s'ils étaient restés en surface.

c) Par dispersion.

Après que le pétrole ait été en majeure partie pompé, la seule méthode pratique pour éliminer la pollution résiduelle et pour rendre aux touristes une plage propre consiste à utiliser des agents dispersants.

L'application du dispersant est très aisée. Elle peut se faire facilement par pulvérisation sur les nappes de pétrole qui surnagent, ou à l'aide de la pelle et du camion pour le nettoyage des plages.

.../

La principale contrainte imposée par l'utilisation d'un dispersant concerne l'agitation qui est nécessaire pour rendre le contact plus étroit entre le produit et l'eau. Pour les nappes flottantes, l'agitation de la mer suffit. Pour les plages, on agite d'abord mécaniquement le dispersant et l'hydrocarbure, puis on ajoute l'eau seulement dans un second temps pour empêcher le pétrole de pénétrer plus profondément dans le sable.

Il est évident que le produit ne doit pas être toxique pour éviter de causer des dégâts à la vie pélagique. Au temps du "Torrey Canyon", les dispersants étaient un mélange de deux composés :

a . Un produit tensio-actif qui dispersait le pétrole en petites gouttelettes de un à quelques microns de diamètre pour faciliter leur digestion par les bactéries.

b . Un solvant aromatique porteur du tensio-actif qui pénétrait dans le pétrole. C'est la présence de ce solvant qui rendait les dispersants, utilisés jusqu'à présent, fort toxiques pour le milieu biologique.

Actuellement, plusieurs laboratoires sont capables, par un essai simple et rigoureux de déterminer, le taux de toxicité des dispersants et le taux de dégradation microbienne de l'huile émulsionnée.

GATELLIER - APPERT (9) et BRIANT - GATELLIER (10) montrent que la dégradation microbienne des hydrocarbures est conditionnée par l'aération, le pH, la température et l'agitation du milieu bactérien. Interviennent aussi la nature des hydrocarbures, des composés dispersants, et surtout leur temps de contact avec les microorganismes.

Par exemple, les bactéries, en présence de pétrole, préfèrent utiliser un composé plus biodégradable, avant de s'adapter à l'utilisation des molécules d'hydrocarbures plus difficilement biodégradables. C'est pourquoi, on doit s'attacher à l'utilisation d'un produit dispersant ne renfermant que des chaînes moléculaires linéaires, de manière à être rapidement et complètement biodégradé.

D'après la carte signalétique du SEFOIL (page 13) ce composé fournit l'apport nutritif et facilement biodégradable du dispersant miracle.

Lors de nos travaux sur les parties actives du SEFOIL et de nos recherches de substances rendant plus efficace la dispersion du pétrole et son attaque par les bactéries, nous nous sommes attachés à l'étude de molécules dont la structure soit susceptible de s'adapter correctement aux systèmes enzymatiques de ces microorganismes marins.

Sefoil poursuit sa carrière dans la lutte contre la pollution

- 13 -

Depuis son expérimentation sur la plage de Dinard en février dernier au cours d'une « pseudo marée noire » organisée par le Centre National d'Etudes pour la protection des éléments matériaux et être vivants, le Sefoil a été utilisé depuis avec succès dans de nombreux cas de dépollution industrielle, qu'il s'agisse du nettoyage d'un réseau d'égout, de bâches alimentaires souillées par une rupture de bouche de réchauffage au mazout, de sols ou de fosse de décantation revêtus d'une couche de fuel léger ou encore de chaudières polluées accidentellement par du fuel.

Les caractéristiques du Sefoil

Le Sefoil est un produit nouveau, découvert par le chercheur français Georges Salomone, qui modifie complètement les propriétés physiques et physiologiques des hydrocarbures. Mélangé dans la proportion de 25 à 60 % au volume de résidus d'hydrocarbures bruts ou raffinés, il les transforme en un produit ininflammable, soluble dans l'eau et non toxique. Composé essentiellement d'hydrates de carbone (glucose et saccharose) et d'acide phosphorique, il permet de réaliser une émulsion stable avec les hydrocarbures et l'eau, sans intervention de tensio-actifs plus ou moins toxiques. Bien mieux, il enrichit le milieu dans lequel il est dissout en permettant le développement des micro-organismes marins qui assurent une dégradation biologique naturelle totale et rapide des résidus pétroliers.

Physiquement, le Sefoil se présente sous la forme d'une pâte fluide ocre clair ($d = 1,60$), ininflammable, non toxique et ne manifestant aucune agressivité vis-à-vis des matériaux traditionnels.

Un programme de recherches scientifiques a été entrepris en raison des propriétés du Sefoil, réalisé par le C.N.E.P. (Centre National pour la Protection des Aliments, Matériaux et Etres vivants), il a permis l'établissement de certificats émanant des laboratoires nationaux et internationaux : Institut Océanographique, B.R.Q.M. (Bureaux de Recherches Géologiques et Minières), Laboratoire de Cryptogamie du Museum National d'Histoire Naturelle de Paris, Laboratoire Mariti-

me du Museum National d'Histoire Naturelle de Paris, Fondation Curie, Institut Fédéral Allemand pour la Pêche (Hambourg).

Sefoil a été présenté le 17 novembre 1969 à l'Académie des Sciences de Paris par Monsieur le Professeur Roger Heim, membre de l'Académie des Sciences.

Il ressort de ces études que les produits pétroliers rejetés dans le milieu aquatique après émulsion avec le Sefoil sont rapidement dispersés, en effet :

— La densité de l'émulsion légèrement supérieure mais voisine de celle de l'eau de mer, permet une facile dispersion sans risque d'accumulation en surface.

D'autre part, sous l'action des micro-organismes marins les hydrocarbures sont rapidement éliminés.

Ceci paraît un des avantages essentiels du Sefoil, son emploi garantissant :

- a) D'éviter l'accumulation sur les fonds marins des déchets pétroliers.
- b) D'éviter la résurgence des hydrocarbures après rupture de l'émission.
- c) Le retour rapide vers le cycle naturel des produits rejetés.

Domaines d'application

En règle générale, le Sefoil permet de résoudre les problèmes que posent le transport, le stockage et l'utilisation des produits pétroliers, que ce soit en cas de sinistres (plan Orsec), ou pour le nettoyage et l'entretien à bord des navires, dans l'industrie ou pour les travaux publics.

En conclusion, il s'agit là d'un produit intéressant dans la lutte contre la pollution. Son seul handicap serait peut être son coût de fabrication (on parle de 1,50 F/kilo) attendu que si une catastrophe se produisait, c'est une quantité avoisinant 20 à 80 % de celle du pétrole à traiter qu'il faudrait utiliser.

Fiche signalétique du SEFOIL
(Pétrole informations.)

TRAVAUX PERSONNELS

DEMONSTRATION DE LA NATURE PROTEIDIQUE
DES FACTEURS EMULSIONNANT LES HYDROCARBURES
PRESENTS DANS LES MELASSES.

1 . Séparation des constituants des mélasses.

Composition chimique des fractions obtenues.

Les mélasses sucrières peuvent être définies comme le sirop résiduel à partir duquel le Saccharose ne peut plus être obtenu cristallisé de façon simple.

Nous n'allons pas nous livrer à une étude physicochimique exhaustive des mélasses, nous nous proposons simplement dans ce chapitre de donner la part d'influence des principaux composants de la mélasse sur le pouvoir tensio - actif de ce résidu vis à vis des hydrocarbures en contact avec l'eau.

I - Séparation des Constituants des Mélasses.

A . Matériel.

1) Les mélasses .

Les échantillons de mélasses nous ont été fournis par les firmes suivantes : Générale Sucrière, Lebaudy - Sommier, Béghin. La teneur en eau étant très variable d'un échantillon à l'autre, nous avons jugé préférable de travailler sur des extraits secs obtenus après une lyophilisation poussée.

2) Dialyse .

La dialyse des solutions de mélasses a été effectuée en tubes de cellophane NOJAX x 23 lavés à l'eau courante, puis placés une nuit dans l'eau distillée. En effet, un lavage préalable des boudins de cellophane élimine les polysides adialysables solubles, constitués de glucose, de xylose et de protides présents dans la membrane de cellophane.

.../

B . Méthodes.

1) Dialyse.

Des solutions aqueuses de mélasse à 40 % sont dialysées pendant 3 jours contre de l'eau distillée à + 4° C et en présence de quelques gouttes d'un mélange de chloroforme et de toluène (V : V) pour prévenir tout développement bactérien.

Les solutions adialysables sont alors transférées dans des tubes neufs de cellophane et la dialyse est poursuivie encore pendant 3 jours.

2) Fractionnement sur échangeurs d'ions.

Les solutions adialysable et dialysable sont passées sur des colonnes de résines à échange de cations (DOWEX 50 x 8, forme acide) puis d'anions (Duolite A 102D x 8, forme formiate) (voir Méthodologie, page 76).

Cette technique décrite par PARTRIDGE (11) permet de réaliser une déminéralisation et un fractionnement des constituants organiques en composés neutres, basiques et acides.

Le liquide effluent constitue la fraction "neutre" qui renferme les glucides. L'échangeur de cations traité par une solution aqueuse d'ammoniaque à 8 % (V : V) nous fournit une fraction "basique" contenant les acides aminés et les peptides.

L'échangeur d'anions traité par une solution aqueuse d'acide formique à 10 % (V : V) nous permet d'obtenir une fraction "acide" renfermant les acides organiques.

La fraction basique est évaporée sous vide à 37° C de façon à éliminer l'ammoniaque. On concentre ainsi jusqu'à 5 ml de solution, puis on reprend par environ 40 ml de méthanol et on évapore de nouveau. Cette opération est répétée 3 fois, de façon à éliminer complètement l'ammoniaque avant de lyophiliser la solution finale que l'on diluera au 1/10 pour obtenir une bonne lyophilisation.

La fraction acide subit le même traitement de façon à éliminer l'acide formique.

L'effluent neutre de la colonne est lyophilisé, directement. Les trois résidus secs sont pesés.

.../

Solution de la fraction
dialysable de mélasse



Dowex 50 x 8

NH_4OH 8 %



Fraction "basique":

- acides aminés
- peptides



Solution effluente "acide"



Duolite A₄₀₂D

HCOOH 10 %



Fraction "acide":

- esters phosphoriques
- acides organiques



Solution effluente "neutre":

- oses neutres
- osides neutres

Figure n° 3

Schéma de fractionnement de la "solution de la fraction dialysable"
sur des échangeurs d'ions.



C . Résultats :

Les rendements en chacune des fractions que nous avons obtenues à partir de 100 g. de mélasse par dialyse puis chromatographie d'échange d'ions, sont réunis dans le Tableau I (page 18).

Il est à noter qu'ordinairement, pour éluer la colonne d'échangeur de cations, on emploie une solution aqueuse d'ammoniaque à 5 % (V : V). Nous avons dû utiliser une solution à 8 % pour éluer complètement la fraction basique. Comme par dosage colorimétrique nous n'avons mis en évidence que des traces d'osamines (qui sont détruites en milieu ammoniacal) nous n'avons pas craint d'éluer après l'apparition de l'odeur d'ammoniaque.

Nous avons dû également augmenter la concentration de la solution d'acide formique jusqu'à 10 % (V : V) pour une élution complète de l'échangeur d'anions.

Les fractions obtenues (neutre - basique et acide) ont été soumises à une étude de leur composition chimique.

II - COMPOSITION CHIMIQUE DES FRACTIONS.

La composition qualitative de chaque fraction du dialysable a pu être déterminée aisément par une analyse chromatographique sur papier. Le dialysable a été étudié non fractionné mais après hydrolyse acide.

Parallèlement, nous avons établi la composition quantitative globale de la mélasse, à l'aide des dosages classiques appliqués en chimie alimentaire (voir Méthodologie page 83).

A - Etude du Dialysable.

1 . Méthodes.

Pour chaque fraction, nous avons utilisé la chromatographie descendante à la température de 20° C et sur papier Whatman n° 1.

Nous avons employé la chromatographie monodimensionnelle pour l'étude des sucres et des acides organiques, et la chromatographie bidimensionnelle pour les acides aminés.

.../

TABLEAU I

Répartition en poids des fractions obtenues par

chromatographie d'échange d'ions à partir de 100 g. de mélasse.

Fraction	Dialysable (en g)	Adialysable (en g)
Totale	97	2,25
Neutre	67,30	1,10
Basique	10,20	0,98
Acide	6,85	0,10



a) Etude des Sucres.

Elle a été effectuée dans le système solvant de PARTRIDGE n butanol/ acide acétique/eau (4 : 1 : 5). La pulvérisation à l'oxalate d'aniline du chromatogramme, suivie d'un passage à l'étuve à 105° C pendant 15 minutes, révèle les aldohexoses et les cétooses en brun, les aldopentoses en rose.

- La quantification en oses neutres de chaque fraction a été réalisée par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS - PHILIPPI (12) modifiée par RIMINGTON (13) (voir Tableau II page 20).

b) Etude des Acides Aminés.

Nous l'avons menée par chromatographie en première dimension dans le solvant de PARTRIDGE, en en seconde dimension dans une solution aqueuse de phénol à 90 % (p : v) saturé d'eau, en atmosphère d'ammoniac et d'acide cyanhydrique .

La révélation des acides aminés et des peptides est obtenue par trempage du chromatogramme dans une solution acétonique de ninhydrine-cadmium à 1 %, suivie d'un chauffage à 105° C pendant 5 minutes.

On révèle sélectivement les acides aminés par trempage dans une solution de ninhydrine à 1 % dans le butanol.

c) Etude des Acides Organiques.

Nous l'avons réalisée en développant la chromatographie dans le solvant acide : butanol - acide formique 3 N (1 : 1) auquel on a joint du formate de sodium 0,05 % pour neutraliser les anions présents et obtenir une bonne migration.

Les acides organiques sont localisés en pulvérisant sur le chromatogramme une solution alcoolique de bleu de bromophénol.

2 . Résultats.

a) Déroulement de la Dialyse.

La chromatographie sur papier de la fraction dialysable et adialysable

.../

TABLEAU II

Résultats du dosage par la méthode à l'orcinol sulfurique

des oses neutres présents dans chaque fraction.

Fractions	p. 100 d'oses neutres
Mélasse	64,3
Adialysable	48,2
Dialysable	66,16
Dialysable neutre	92,5
Dialysable basique	2,2
Dialysable acide	2,4



nous permet de suivre le bon déroulement de la dialyse. Après 3 jours la dialyse est incomplète, car après révélation par l'oxalate d'aniline, la fraction adialysable renferme encore de nombreux sucres dialysables. Après 6 jours, la dialyse est complète ; la fraction adialysable est totalement dépourvue de sucres de faible masse moléculaire, elle reste au trait de départ ; les substances de haut poids moléculaire ne migrant pas.

b) Composition des fractions "neutre", "basique" et "acide".

Les différents chromatogrammes obtenus appellent les commentaires suivants :

- La fraction "neutre" correspondant aux dérivés dont les caractéristiques d'ionisation leur confèrent un comportement neutre, révèle la présence d'un triose : le raffinose, d'une forte proportion de saccharose et des oses dérivés de la dégradation de ces deux osides : galactose - glucose et fructose.
- La fraction "basique" représentant l'ensemble des constituants ionisés positivement et fixés sur la Dowex 50 renferme :
 - . Les acides aspartique et glutamique qui sont prépondérants.
 - . Des acides aminés neutres, avec en particulier les deux acides aminés hydroxylés : Sérine - Thréonine.
 - . L'acide γ aminobutyrique et de petits peptides.
 - . Un acide aminé basique à l'état de trace : la lysine.
- La fraction "acide" qui correspond aux constituants ionisés négativement et fixés sur la Duolite A102D, ne contient qu'une quantité très négligeable d'oses neutres, par contre elle renferme de nombreux acides organiques avec en proportion importante l'acide acconitique, puis en plus faible quantité, les acides citrique, malique et succinique.

B . Etude particulière de la fraction entière de l'Adialysable.

1 . Méthodes.

a) Hydrolyse.

Dans le but de vérifier la présence de sucres branchés et de grandes chaînes peptidiques, nous avons effectué :

.../

- Une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 1,5 N à 100° C pendant 90 minutes pour rompre les liaisons osidiques.
- Une hydrolyse en tube scellé sous vide par l'acide chlorhydrique 5,6 N redistillé, à 105° C pendant 24 h., pour rompre les liaisons peptidiques.

b) Purification de l'hydrolysate et Analyse.

Le premier hydrolysate est dilué jusqu'à HCl 0,1 N, puis purifié sur échangeur d'ions. L'effluent neutre est soumis à une chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le système-solvant de JERMYN - ISHERWOOD (14) Pyridine / acétate d'Ethyle / eau (1 : 2 : 2) pendant 24 h. On révèle les oses libérés par le réactif à l'oxalate d'aniline.

Le second hydrolysate résultant de l'action de HCl 5,6 N, est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif sous vide, avec l'aide de plusieurs adjonctions d'alcool méthylique pour faciliter l'élimination de l'acide. Le résidu est ensuite repris par de l'eau distillée et soumis sur papier Whatman n° 3 à une électrochromatographie bidimensionnelle dans les conditions suivantes :

- . 1ère dimension : électrophorèse à Ph 3,9 dans le tampon de MICHL (15) pyridine/acide acétique/eau (3 : 10 : 487).
- . 2ème dimension : chromatographie dans le système-solvant de PARTRIDGE (16).

2 . Résultats.

a) Etude de la fraction sucre.

- La révélation à l'oxalate d'aniline du chromatogramme de l'hydrolysate effectué par HCl 1,5 N montre la présence de 4 oses neutres :
 - . 3 hexoses révélés en brun : Galactose, Glucose et Fructose.
 - . 1 pentose révélé en rose : l'Arabinose.

Aucun spot n'est visible au trait de départ.

.../

Cet aldopentose et ces 3 hexoses proviennent de la coupure par l'agent d'hydrolyse des liaisons de sucres branchés à base de raffinose et de saccharose.

Le Fructose est en plus faible proportion car les cétooses sont partiellement détruits par l'action de l'acide chlorhydrique.

- Le dosage des oses neutres par la méthode à l'orcinol sulfurique nous a permis de quantifier cette fraction sucre (voir Tableau II, page 20).

- La révélation par le réactif à la ninhydrine de l'électrochromatogramme de l'hydrolysats effectué par HCl 5,6 N met en évidence de nombreux acides aminés déjà rencontrés dans la fraction basique du dialysable. L'électrochromatographie révèle en outre en position cathodique extrême l'éthanolamine et une tache jaune dans la zone de migration de la β alanine.

Les résultats de ces hydrolysats chlorhydriques et un fractionnement de l'adialysable sur gel de Sephadex G.50 d'une part et sur Sephadex G.25 d'autre part, nous permettent d'affirmer que la fraction adialysable de la solution de mélasse renferme en quantité égale, une fraction de sucres branchés de masse moléculaire conséquente et une fraction protéidique importante.

C - Bilan de la composition chimique de la mélasse.

1 . Protocole.

Nous avons établi la composition quantitative globale de la mélasse par des méthodes de dosage classiques (Voir Méthodologie, page 83).

2 . Résultats .

Le Tableau III (page 24) fournit les résultats des différentes déterminations chimiques que nous avons effectuées.

.../

TABLEAU III

COMPOSITION CHIMIQUE DES ELEMENTS ORGANIQUES

ET MINERAUX DE LA MELASSE

Déterminations	Pour 100 grammes de produit brut
. Humidité	20,23
. Matière sèche	79,77
- <u>Eléments organiques</u>	
Azote total	0,72
Protides totaux	4,50
Lipides totaux	0,18
Composés acides	5,03
Glucides totaux	58,34
- Glucides directement réducteurs	16,11
. Glucose	6,97
. Fructose	8,78
. Autres réducteurs	0,36
- Glucides non réducteurs	41,74
. Saccharose	35,28
. Raffinose et autres non réducteurs	6,46
- <u>Eléments minéraux</u>	
- Cendres (potassium, calcium, magnésium chlorures).	12,03



Il nous indique que la mélasse renferme une très forte proportion d'oses neutres et plus particulièrement de saccharose. Les matières lipidiques sont à l'état de traces, alors que les taux de protéines et de composés acides sont loin d'être négligeables. On retrouve les résultats fournis par l'analyse chromatographique sur papier des fractions obtenues après dialyse et passage sur échangeurs d'ions.

La teneur en sels minéraux est également élevée, d'après nos différents dosages ce sont surtout les ions potassium, calcium et magnésium qui sont prépondérants.

III - CONCLUSIONS.

La dialyse de la solution de mélasse a montré que les mélasses sucrières renfermaient d'une part une forte proportion de composés dialysables, notamment des sucres non réducteurs : du saccharose en particulier, des sucres réducteurs : Glucose - Fructose, des acides aminés hydroxylés, de l'acide acconitique et d'autre part une fraction protéidique importante qui ne dialysait pas.

Le fractionnement de la solution du dialysable sur échangeurs d'ions, nous a permis de concentrer les sucres dialysables dans l'effluent "neutre" de l'échangeur.

Les acides aminés et les petits peptides se trouvant concentrés dans l'effluent "basique" de l'échangeur de cations. La fraction "acide" renfermant en très faible quantité un mélange des deux premières fractions mais aussi une proportion importante d'acides organiques : notamment l'acide aconitique.

L'hydrolyse chlorhydrique de l'adialysable a mis en évidence les mêmes composés que ceux déjà relevés dans les fractions du dialysable. La mélasse en plus de la forte teneur en sucres et en acides aminés libres, renferme donc environ 2,5 % de sucres polymérisés et protéides qui ne dialysent pas.

L'étude de la présence éventuelle de lipides dans les mélasses s'étant révélée presque négative (les matières grasses étant à l'état de traces) la possibilité d'un pouvoir tensio actif des mélasses ne peut reposer que sur la partie glucidique, ou acide, ou protéinique, ou bien de la synergie de ces fractions.

2 . Localisation de la substance tensio-active des Mélasses.

Nous avons défini un critère d'émulsion et effectué le contrôle de l'activité tensio-active de chacune des fractions de mélasse.

I - DEFINITION D'UN CRITERE D'EMULSION.

A . Méthodes.

Voir Méthodologie, page 86 .

1) Préparation des mélanges émulsionnants.

Nous avons appliqué le protocole expérimental utilisé par SALOMONE (17) pour la fabrication du SEFOIL, mais nous avons modifié la concentration de chaque ingrédient dans le produit final.

2) Mode opératoire.

Nous avons observé que les milieux très ionisés, comme l'eau de mer favorisaient l'émulsion du pétrole brut. Toutes nos expériences ont donc été réalisées en présence d'eau de mer stérile, et sous agitation.

B . Résultats - Discussion.

1) Dispersion du pétrole brut dans l'eau.

Dispenser un hydrocarbure dans l'eau, c'est le mettre sous forme de fines gouttelettes qui n'auront plus tendance à se regrouper. Ce processus de subdivision de la phase huileuse implique la création d'une interface supplémentaire hydrocarbure - eau, et donc une augmentation de l'énergie libre de surface du système que l'on peut décrire ainsi :

.../

- 1 goutte d'hydrocarbure de diamètre 1 cm et de surface 3,14 cm² peut générer 1 000 gouttelettes de diamètre 0,1 cm et de surface totale 31,4 cm², puis 1.000.000 de fines gouttelettes de diamètre 0,01 cm et de surface totale 314 cm².

Cette énergie doit être fournie par une source extérieure, sinon le système évolue vers un état correspondant à une aire interfaciale minimale, les petites gouttelettes coalescent provoquant ainsi une diminution très nette de l'énergie libre de surface du système.

Aussi appliquons nous une agitation mécanique poussée pour créer cet état dispersé.

2) Stabilisation de la dispersion.

a) Action de l'agent tensio-actif.

Le pétrole et l'eau ne peuvent pas donner d'émulsion stable quelque soit le moyen mécanique utilisé pour réaliser la dispersion. Les forces de Van der Waal's entre les chaînes d'hydrocarbures attirent les molécules entre elles en une association très étroite tandis que les forces d'attractions entre les molécules d'eau excluent les groupements hydrophobes de la phase aqueuse (DURHAM) (18).

Aussi très vite les gouttelettes éparpillées d'hydrocarbure fusionnent, et le pétrole et l'eau se séparent de nouveau en deux couches. Pour que l'émulsion soit stable, il faut la présence d'une troisième substance : l'agent émulsionnant qui en s'adsorbant et s'orientant à la surface des gouttelettes, les enrobe en créant une barrière de potentiel physicochimique qui s'oppose ainsi à la cohésion qui tend à les faire fusionner (OSIPOW et al.) (19).

b) Influence d'une phase dispersante ionisée :

L'eau de mer, en présence d'agent émulsionnant, favorise la dispersion de l'hydrocarbure, car du fait de l'orientation de l'agent de surface aux interfaces gouttelettes - eau, chaque particule se trouve entourée de doubles couches électriques dont l'interpénétration crée des forces de répulsion qui empêchent la coalescence (voir schéma, page 28).

.../

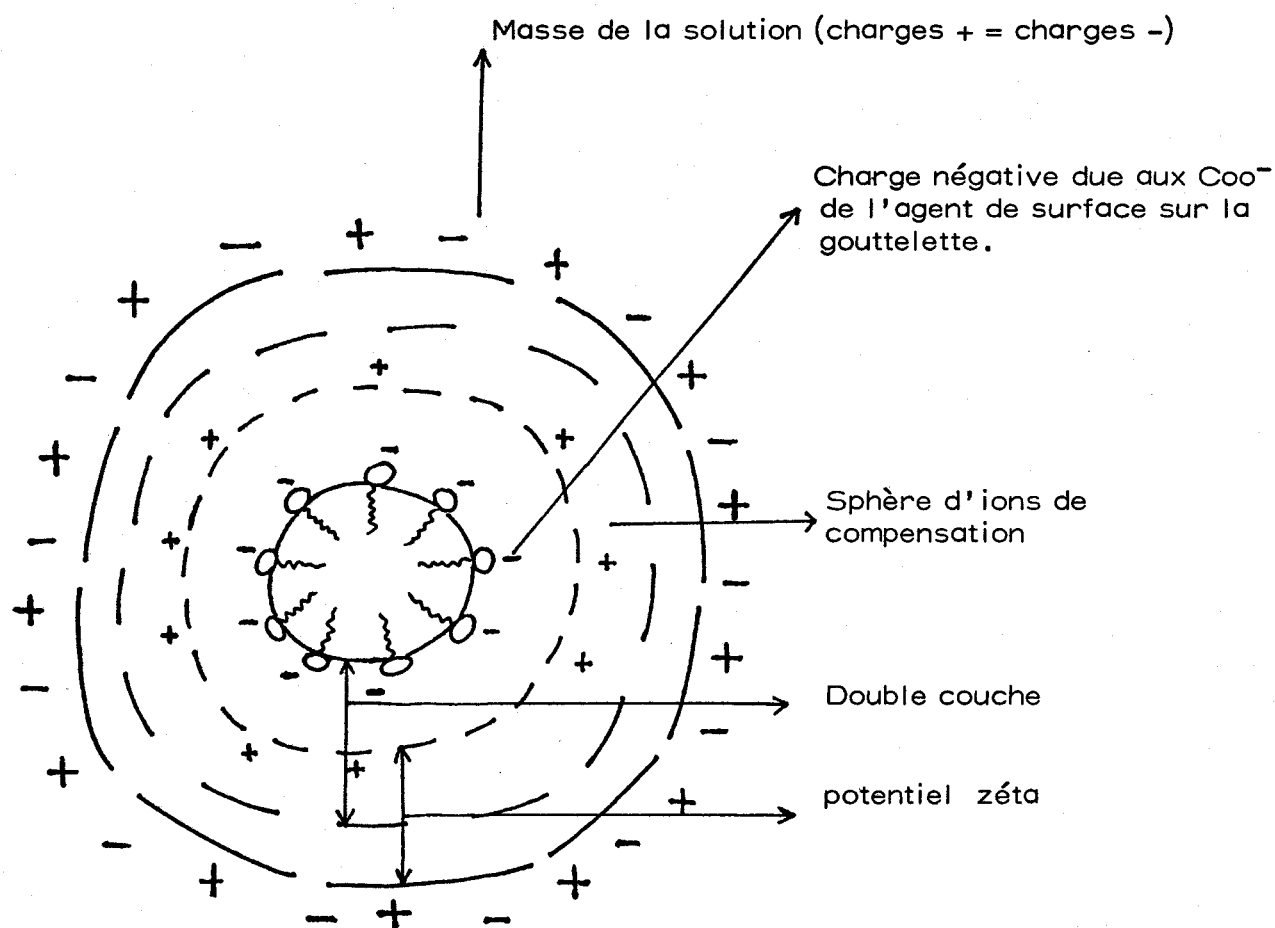


Figure n° 4

Représentation schématique
des doubles couches électriques.

JENNINGS(20) montre cependant que même dans une phase dispersante eau distillée, des agents de surface non ioniques se révèlent de bons agents de suspension à cause de la couche d'hydratation qui entoure chaque gouttelette et qui constitue une zone tampon s'opposant au rapprochement des gouttelettes.

C . Conclusion.

L'émulsion pétrole - eau est un système hétérogène constitué par la dispersion de fines gouttelettes d'hydrocarbures dans la phase aqueuse continue. Ce système est en réalité instable en absence d'agent émulsionnant, car les gouttelettes formées par apport d'énergie mécanique tendent à se rassembler et l'équilibre du système se déplace dans un sens tel qu'il apparait très vite une séparation nette des deux phases.

Aussi lors de l'étude de l'activité tensio-active de nos différentes fractions, toutes choses étant égales par ailleurs - agitation - phase dispersante - et concentration du produit - , la formation de gouttelettes qui resteront fixées sur les parois du tube test représentera le critère d'émulsion parfaite.

II - ETUDE DE L'ACTIVITE TENSIO - ACTIVE DES FRACTIONS.

A . Essais préliminaires.

Des essais préliminaires avec un produit préparé à partir d'un échantillon de mélasse Lebaudy - Sommier selon les normes de SALOMONE, nous ont montré que :

- Le produit est inactif lorsque le pétrole est déjà en présence de l'eau. La mélasse qui renferme une très forte proportion de sucres est trop soluble dans l'eau. Le produit trop hydrophile se précipite vers l'eau car il n'a pas une partie assez hydrophobe pour se précipiter vers l'hydrocarbure. Aussi, durant tous nos tests, le mélange pétrole - produit a été réalisé avant l'addition d'eau.

- L'activité émulsionnante du produit est augmentée si le mélange est préparé 15 jours avant l'emploi et stocké à + 20° C.

.../

- La présence de phosphate diamonique dans la préparation du produit est indispensable pour assurer la stabilité de l'émulsion. Quant au phosphate bicalcique utilisé, ce doit être du phosphate BILLAULT qualité "vétérinaire" pour que le produit préparé ait une certaine fluidité de façon à rendre plus facile et plus efficace son contact avec l'hydrocarbure.

- D'autres essais avec des produits à base de mélasses provenant des firmes Générale Sucrière et Béghin nous ont montré en outre que le type de mélasse n'a aucune importance sur les propriétés du produit.

B . Activité tensio - active des fractions.

Nous avons déterminé l'activité tensio - active des fractions les plus abondantes en appliquant le protocole décrit dans Méthodologie (page 86).

Les résultats que nous avons obtenus sont résumés dans le tableau IV (page 31)

La mélasse renfermant une très forte teneur en sucres, nous avons pensé à une action prépondérante des sucres, or les résultats exprimés par le Tableau IV, montre que la fraction "neutre" du dialysable qui renferme la presque totalité des sucres de mélasse, est inactive.

Ce résultat s'est trouvé confirmé par la préparation de produits à partir de mélanges réalisés avec des oses neutres purs : Raffinose - Saccharose - Glucose, à des concentrations différentes. Ces produits se sont révélés inefficaces. Aucune gouttelette ne s'est formée, le pétrole continuant à flotter à la surface de l'eau de mer.

Seule la fraction adialysable est réellement efficace. Elle est capable en tube à essais, de rompre sous agitation mécanique, le film du pétrole en fines gouttelettes qui viennent se coller sur les parois du tube.

Le tube abandonné à l'air libre à 20° C présente au bout de deux heures à la surface un matelas fort compact. La fraction adialysable a formé une sorte d'éponge très tenue qui retient le pétrole. Si l'on renverse le tube, le matelas ne se rompt pas, la phase aqueuse est prisonnière, le produit qui n'a pas été utilisé pour émulsionner l'hydrocarbure s'est dissous dans la phase aqueuse qui s'est colorée.

.../

TABLEAU IV

Activité émulsionnante des fractions
d'après le test d'efficacité en tube à essai .

Fraction	Activité
Mélasse	++
Adialysable	+++
Dialysable	+
Dialysable basique	++
Dialysable neutre	0
Dialysable acide	0



Cette formation d'un matelas compact est à rapprocher des observations de F.M. ASCHERSON en 1838, rapportées par BIKKERMAN (21) qui avait noté qu'un simple contact d'une huile avec une solution aqueuse de protéine provoquait la formation de "peaux protéiniques" à l'interface des deux liquides.

La fraction basique du dialysable présente aussi une activité tensio - active mais moins importante que celle présentée par la fraction adialysable.

Les résultats consignés dans le Tableau V résument bien les différences, concernant les quantités de produit et le temps d'agitation nécessaires pour réaliser l'émulsion, qui existent entre ces deux fractions actives.

Ce Tableau appelle les commentaires suivants :

- . Pour les deux fractions : Adialysable et Dialysable basique, le temps minimum d'agitation nécessaire pour obtenir un début d'émulsion est de 2 minutes, lorsque la quantité de mélange émulsionnant ajoutée est égale au poids du pétrole (100 %).
- . Les deux fractions présentent leur activité maximale pour une quantité de mélange émulsionnant égale à 50 % du poids du pétrole.

III - CONCLUSIONS.

Les mélasses se sont révélées, dans une certaine mesure, capables d'émulsionner les hydrocarbures. A l'origine, nous pensions que les sucres en forte proportion dans les mélasses, étaient les facteurs prépondérants du pouvoir tensio - actif de ces mélasses.

Comme dans la préparation du produit émulsionnant, il entrainait de l'acide phosphorique, nous avons pensé que les sucres en milieu acide étaient dégradés en dérivés du furfural capables alors d'émulsionner le pétrole.

Nous avons orienté nos recherches dans ce sens, mais par la suite l'étude des différentes fractions obtenues par passage sur résines échangeuses d'ions, nous a montré que la fraction neutre du dialysable était totalement inactive.

Par contre, la grande activité de la fraction adialysable, d'une part, l'activité de la fraction "basique" du dialysable qui contient les acides aminés et les peptides, d'autre part, nous ont amené à poser en hypothèse que les protéides de la mélasse étaient les agents émulsionnants du SEFOIL.

.../

TABLEAU V

Mesure de l'efficacité de la fraction basique du dialysable.

Pourcentage de produit émulsionnant	Temps d'agitation (minutes)				
	1	2	4	8	16
25	0	0	0	0	0
50	0	0	±	++	++
100	0	+	++	++	++

Mesure de l'efficacité de la fraction adialysable.

Pourcentage de produit émulsionnant	Temps d'agitation (minutes)				
	1	2	4	8	16
25	0	0	0	±	±
50	0	±	++	+++	+++
100	0	++	+++	+++	+++



3 . Vérification de l'activité tensio - active des Protéides de Mélasses.

L'activité présentée par la fraction adialysable permet d'avancer l'hypothèse de la nature protéidique des agents émulsionnants renfermés par les mélasses.

Nous avons orienté nos recherches vers des protéides purs pour renforcer cette hypothèse.

I - ESSAIS PRELIMINAIRES : ACTION de PROTEIDES VARIES :

A . Méthode.

Nous avons préparé des mélanges émulsionnants à base de protéides selon le protocole expérimental décrit dans Méthodologie (page 86).

Nous avons complété notre test d'activité par une estimation du taux de protéines participant à l'émulsion du pétrole et à la constitution du matelas.

Cette estimation a été menée par dosage dans la phase aqueuse décantée de l'azote résiduel, selon la méthode de KJELDAHL (22).

B . Résultats.

Les émulsions réalisées suivant notre test d'efficacité, nous ont permis d'observer que la caséine, la sérum albumine et les protéides du lactosérum possédaient une activité émulsionnante plus importante que celle présentée par l'adialysable de mélasse. Surtout la caséine qui fournit une finesse d'émulsion très supérieure à celle donnée par l'action des autres protéines.

.../

Ces observations sur la formation et la tenue des différentes émulsions, sont corroborées par les résultats du dosage de protéines restées dans la phase dispersante après décantation. En effet, on s'aperçoit, Tableau VI (page 36), que 20 % seulement des protéides de mélasses participent à l'élaboration de l'émulsion, alors que 50 % de caséine se sont adsorbés à la surface des gouttelettes et contribuent à la formation du matelas.

Signalons, en outre, que les trois principaux protéides utilisés permettent l'émulsion de l'hydrocarbure en présence d'eau, alors que la fraction adialysable de mélasse est inactive dans ces conditions.

Ceci tendrait à prouver que la fraction Adialysable de par sa forte teneur en sucres (environ 50%) Voir Tableau II, (page 20) serait beaucoup trop hydrophile pour se lier rapidement et efficacement aux gouttelettes d'hydrocarbure dispersées par l'agitation.

II - ETUDE PARTICULIERE de L'EMULSION REALISEE par la CASEINE.

A . Généralités.

1) La caséine.

Principal constituant protéidique du lait, la caséine brute représente environ 80 % des protéides totaux du lait. On sait qu'il existe 4 caséines. Elles se trouvent dans le lait de vache sous la forme de sels de calcium : les caséinogènes.

Les Travaux de CRAVIOTO - MUNOZ et al. (23) ont montré que 3 caséines : les caséines α , β et γ ne renferment pas de glucides, seule la 4ème, la caséine K contient 5 % de glucides totaux. Cette glycophosphoprotéine joue d'ailleurs le rôle de colloïde protecteur en formant avec les caséines α , β et γ des micelles stables en présence d'ions calcium (WAUGH et VON HIPPEL). (24).

Des études sur la biréfringence des solutions de caséinate de soude réalisées par NITSCHMANN et GUGGISBERG (25) ont montré que les molécules de caséine avaient la forme de baguettes avec un rapport axial de 8,7 et une longueur de 290 Å. On sait en outre que les nombreuses chaînes polypeptidiques sont réunies non par des ponts disulfurés mais par des liaisons hydrogènes. L'acide phosphorique apporte également sa contribution aux liaisons en estérifiant la fonction alcool des acides aminés hydroxylés : Sérine et Thréonine.

.../

TABLEAU VI

MESURE DE L'EFFICACITE DE DIVERS PROTEIDES

(pour un pourcentage de produit émulsionnant égal
à 50 p.100 du poids du pétrole.)

PROTEIDES	% de protéines dans la phase aqueuse	Agitation en mn	
		2	4
Adialysable de mélasse	81,2	+ -	++
Caséine	48,8	++++	++++
Lactosérum	63,4	+±	++±
Sérum albumine	54,7	++	+++



D'après GORDON et al., la caséine brute renferme 110 groupements cationiques et 101 groupements anioniques. (équivalent/ 10^5 g. de protéine). d'autre part, MELLON et coll. démontrent que les deux tiers des groupements ϵNH_2 de la lysine de la caséine ne réagissent pas avec le fluorodinitrobenzène car ils sont "masqués" par suite de la structure secondaire particulière de la molécule de caséine.

2) Le pouvoir émulsifiant de la caséine.

L'émulsion du pétrole dans l'eau réalisée en présence d'une faible quantité de caséine obéit aux lois générales des dispersions et en particulier à la loi de Stokes :

$$V = \frac{2 \text{ g. } (d - d') R^2}{9 \eta}$$

V étant la vitesse ascensionnelle des gouttelettes d'hydrocarbure, R le rayon moyen des gouttelettes, $d - d'$ la densité des phases en présence et η la viscosité de la phase continue.

Cette loi montre que plus la vitesse ascensionnelle des gouttelettes est élevée, plus la couche de pétrole se reforme rapidement. Elle souligne l'importance des facteurs : taille des gouttelettes et viscosité de l'eau et permet aussi de comprendre le mode d'action de la caséine qui en s'adsorbant et s'orientant à la surface des gouttelettes d'hydrocarbure formées au cours de la dispersion mécanique, prévient une éventuelle réagglomération de ces gouttelettes en jouant un effet de bipoles se repoussant.

La tendance à la répulsion devient alors plus forte que la force ascensionnelle, et l'émulsion est réalisée.

B . Modification de la préparation du produit.

Jusqu'ici, nous avons fabriqué les produits émulsionnants selon les normes de SALOMONE que nous avons adaptées (Voir Méthodologie, page 86).

.../

Mais nous avons remarqué ensuite que l'efficacité de la caséine augmentait lorsqu'elle se trouvait débarrassée de l'acide phosphorique et du phosphore bicalcique. En présence de ces deux agents, le produit était peu fluide, ce qui rendait difficile son contact avec une grande surface de l'hydrocarbure.

La meilleure émulsion que nous avons obtenue lors de nos nombreux essais, a été réalisée avec une solution aqueuse de caséine à 5 % additionnée de 1,75 g de phosphate diammonique.

Cette solution (100 ml) jetée sur 50 ml de pétrole brut EDJELE flottant à la surface d'une cuve contenant 4 l d'eau de mer, s'est révélée capable de disperser dans toute la phase aqueuse les gouttelettes d'hydrocarbures formées par une forte agitation mécanique. Une heure après, une nouvelle addition de 50 ml de pétrole, sous agitation, s'est trouvée de nouveau dispersée.

Quarante huit heures après le début d'émulsion, la cuve test présentait un film émulsifiant superficiel très compact ("matelas") et un dépôt de protéine. Ces observations sont à rapprocher des "peaux protéiniques" d'ASCHERSON (28) et semblent montrer qu'une dénaturation de la caséine native s'est produite provoquant de ce fait une perte sensible de la solubilité de la protéine dans l'eau.

C . Etude de la stabilité de l'émulsion formée par la caséine.

Nous avons étudié l'influence de la température et des sels dissous sur la stabilité de notre émulsion hydrocarbure - caséine - eau. Nous avons déterminé la stabilité d'après le volume de la phase aqueuse décantée, mesuré exactement 1h après l'émulsification. Toutes les expérimentations ont été réalisées à la température du laboratoire (environ 21° C.).

1) Influence de la Température.

Nous avons porté nos émulsions témoins pendant 10' à diverses Température ° C (de 25° C à 75° C , en appliquant 5° C supplémentaire pour l'échantillon suivant). Après refroidissement rapide dans de la glace jusqu'à 21° C, on a relevé le volume de la phase aqueuse décantée 1h après le début de l'expérience.

.../

Les résultats des différents volumes mesurés, montrent que la température favorise la floculation et la coalescence des gouttelettes car elle augmente la fréquence des chocs et par suite, la vitesse de séparation des phases. Dès 70° C, la viscosité du mélange est très réduite et l'émulsion se casse rapidement.

2) Influence des Electrolytes :

Nous avons souligné le fait que l'eau de mer favorisait le pouvoir émulsifiant des protéides de mélasses. On s'aperçoit cependant, en augmentant d'un coefficient de 1,4 la concentration en chlorure de sodium de la phase dispersante que l'émulsion réalisée par la caséine perd de sa stabilité, la décantation de sa phase aqueuse étant légèrement plus rapide. KLEVENS (29) montre que le sel agit sur l'équilibre électrostatique des interfaces et contre-carre la répulsion électrique entre les gouttelettes, diminuant ainsi la stabilité de l'émulsion.

Quand nous doublons la concentration en NaCl, une floculation de l'émulsion est observée, suivie très vite d'une coalescence des globules d'hydrocarbure qui conduit à la séparation en deux phases. Les Travaux de MATALON (30) et VAN DEN TEMPEL (31) sur des émulsions d'huiles minérales dans l'eau stabilisées par du dodécyl sulfate de sodium, montrent que ce phénomène est dû à une réduction de la charge des gouttelettes par la couche diffuse d'ions salins qui enferme la gouttelette et neutralise ses charges. Il y a floculation, puis la coalescence se produit à cause de la déshydratation par la couche d'ions salins du film d'eau qui entoure chaque globule.

Nous observons par ailleurs que l'adjonction de phosphate diammonique n'a aucune influence significative sur la tenue de l'émulsion, par contre, le fait d'augmenter la concentration du milieu en ions calcium sous forme de chlorure de calcium, provoque une précipitation de la caséine et entraîne une destabilisation de l'émulsion.

MECANISME D'ACTION DES PROTEIDES

EMULSIONNANT LE PETROLE BRUT

1 . Mise en évidence du mécanisme d'action.

L'activité présentée par la fraction adialysable et les protéides purs testés, nous a permis d'affirmer la nature protéidique de l'agent des mélasses capable d'émulsionner le pétrole brut.

Pour comprendre le mécanisme d'action de ces protéines, nous avons eu recours à la microscopie et à la chromatographie en phase gazeuse.

I - MICROSCOPIE.

A . Microscopie photonique.

1) Méthode.

Nous réalisons une émulsion de pétrole brut avec la fraction adialysable en appliquant le procédé en tube à essais décrit dans Méthodologie (page 89) . Nous abandonnons l'émulsion 24 h , à l'air libre, temps suffisant pour que le matelas pétrole adialysable se forme. Puis des photographies sont réalisées à partir de prélèvements effectués sur le matelas.

2) Résultats.

La microscopie photonique montre que l'émulsion est constituée de fines gouttelettes d'hydrocarbures entourées d'une coque plus dense (fig. 5; page 41). Cependant la faible résolution de cette technique limite l'examen de cette couche membranaire dense et la visualisation des petits globules d'hydrocarbures.

B . Microscopie Electronique

1) Méthode.

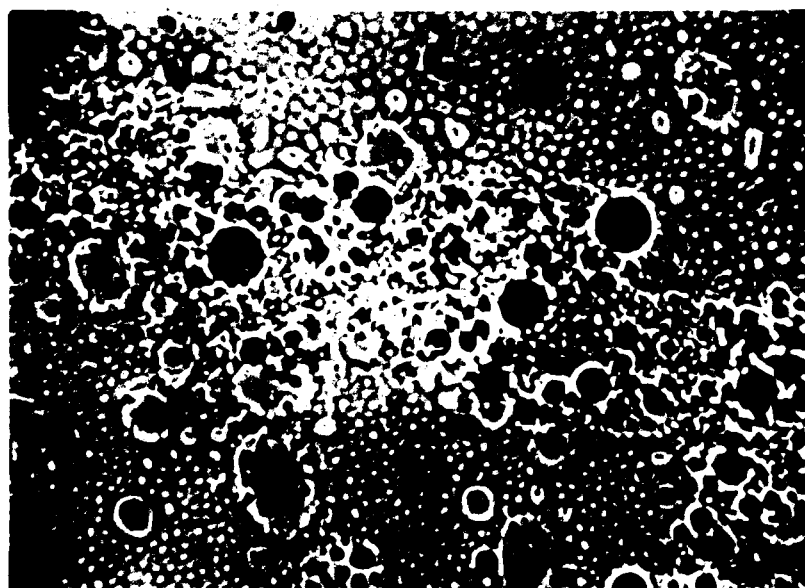


Figure n° 5

Microscopie photonique des gouttelettes obtenues en émulsionnant du pétrole brut avec la fraction adialysable des mélasses. On remarquera la molécule plus dense qui entoure chaque globule et qui est constitué par l'agent tensio - actif.

La méthode d'utilisation de nos préparations pour les observations en microscopie électronique est décrite dans Méthodologie (page 89).

2) Résultats.

La microscopie électronique ne révèle plus que les "enveloppes" constituées par des protéides "tannés", la partie centrale occupée par l'hydrocarbure ayant disparu sous l'action de l'éthanol utilisé au cours de la préparation des pièces en vue de l'observation au microscope électronique (fig. 6 , page 43).

Chaque particule d'hydrocarbure se trouve enveloppée par une mince pellicule de protéine qui la protège mécaniquement d'une autre particule, et constitue de ce fait un obstacle à la coalescence qui tend à se produire sous l'influence de la pesanteur et des forces électriques ou dynamiques.

La chromatographie en phase gazeuse est venue confirmer l'existence de cette protection mécanique du globule d'hydrocarbure par la coque protéinique.

II - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

A . Matériels et Méthodes.

Voir Méthodologie (page 90)

1) Matériels.

Nous avons étudié trois produits provenant de mélanges réalisés en eau de mer stérile selon le mode opératoire classique.

- 1 . Le produit témoin provenant d'un mélange de pétrole brut et d'eau de mer stérile.
- 2 . Le produit résultant de l'émulsion pétrole - caséine.

.../



Figure n° 6

Microscopie électronique des gouttelettes de pétrole émulsionné ($\times 120.000$). La coque protéidique est nettement visible. Elle délimite un centre clair dont le pétrole a été éliminé par l'éthanol employé dans la technique de fixation des préparations.

3 . Le produit de l'émulsion pétrole - adialysable de mélasse.

Les trois mélanges ont été abandonnés trois semaines à $+ 20^{\circ} \text{C}$ dans des ampoules à décanter bouchées.

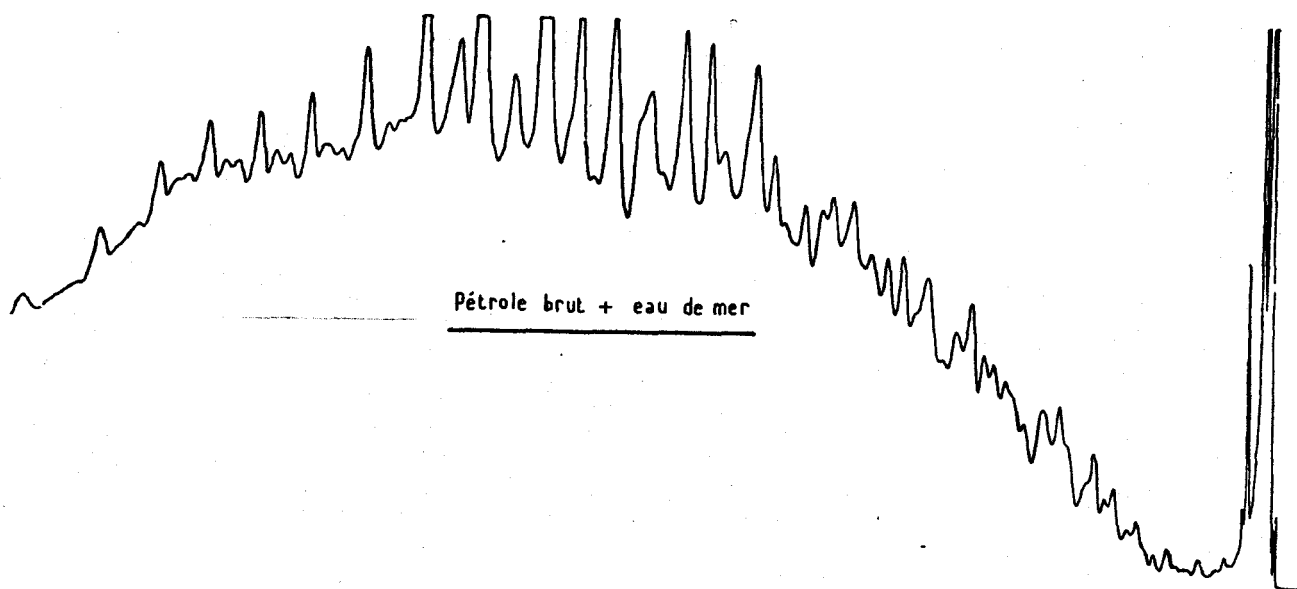
2) Méthodes.

Au bout de trois semaines, on extrait les hydrocarbures restants par l'éther diéthylique. On décante d'abord soigneusement la phase aqueuse. Pour éliminer le surplus de produit accroché à la phase organique, on lave l'émulsion 3 fois par l'eau distillée. Puis les phases aqueuses étant éliminées, on extrait par l'éther. Les extraits sont ensuite concentrés dans des conditions d'évaporation très douces.

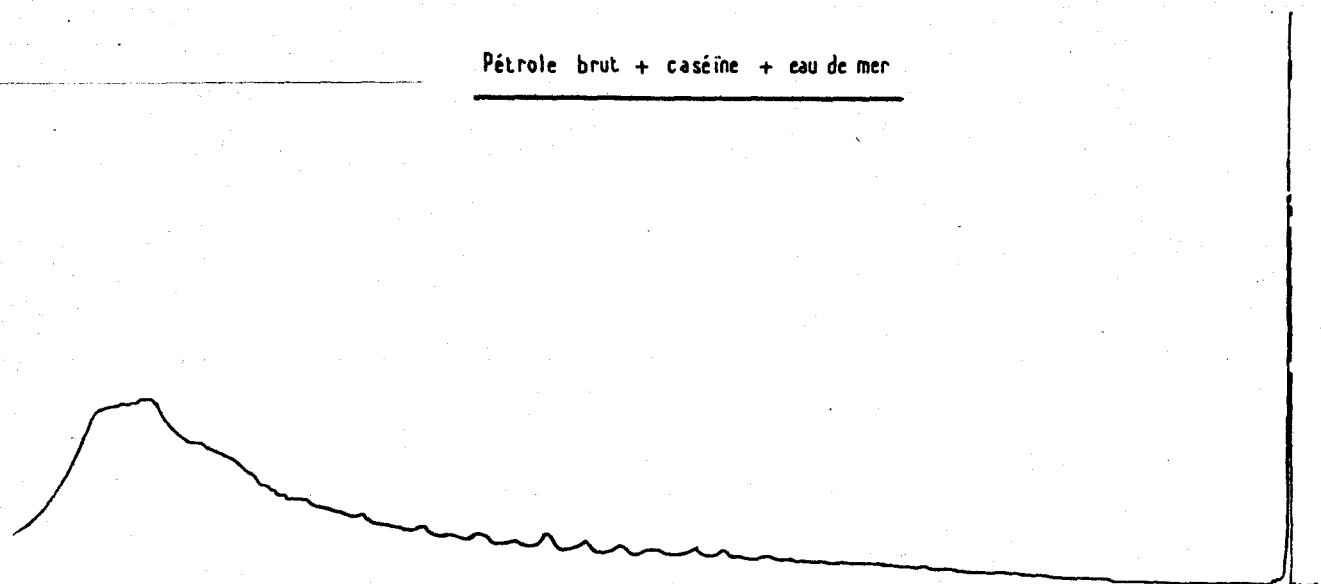
Chaque produit d'extraction est étudié en chromatographie gazeuse sur une colonne de chromosorb W, HMDS siliconé par 5 % de SE 30.

B . Résultats.

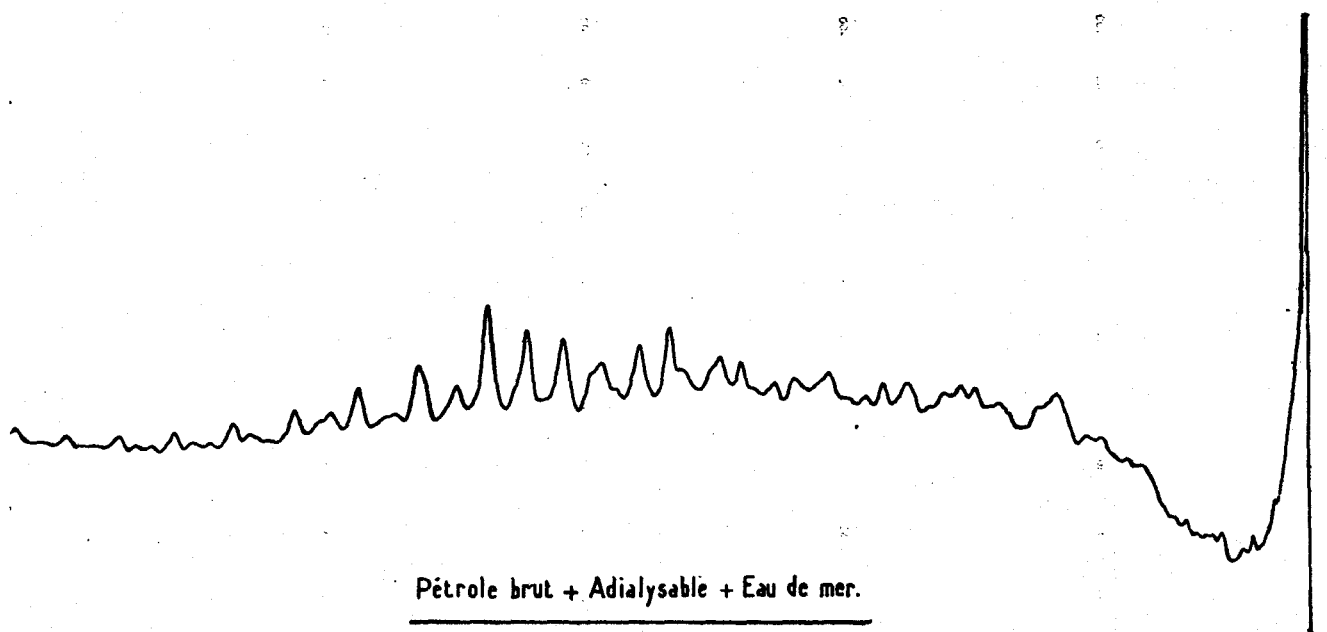
- Le chromatogramme 1 (ci-dessous) développé sous une programmation de température de 50 à 240°C ($2^{\circ} \text{C/Minute}$) montre que le produit résultant de l'extraction étherée du mélange pétrole brut - eau de mer renferme de nombreux hydrocarbures. En l'absence d'agent émulsifiant, le pétrole brut non émulsionné est resté presque intact, seules quelques parties des fractions les plus légères se sont évaporées lors de l'extraction par le solvant.



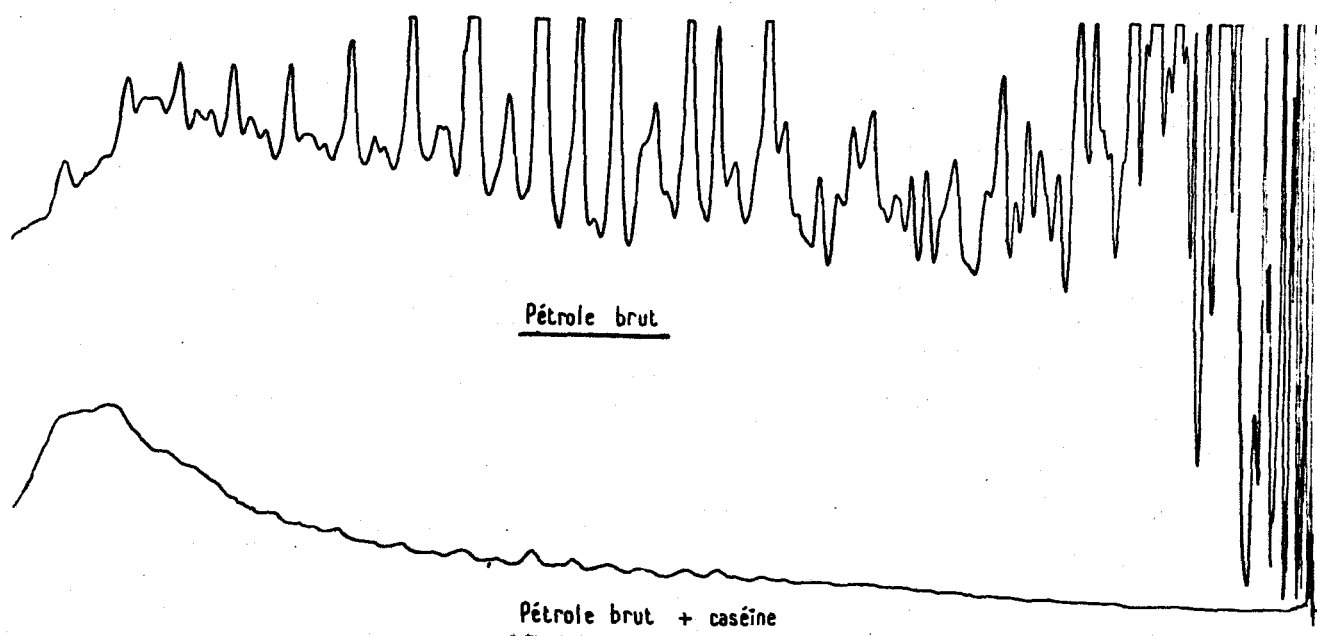
- Le chromatogramme 2 (ci-dessous) montre que le produit d'extraction de l'émulsion pétrole - caséine - eau, ne renferme partiquement plus d'hydrocarbures, seules persistent quelques traces des fractions les plus lourdes.



- Le chromatogramme 3 nous permet de constater qu'une partie des fractions du pétrole émulsionné par l'adialysable de mélasse a disparu mais en quantité nettement moins importante que sur le chromatogramme 2. Cela tend bien à prouver que la fraction protéinique de l'adialysable de mélasse n'a pas une capacité émulsifiante suffisante pour recouvrir les gouttelettes d'hydrocarbures et qu'elle est un facteur émulsionnant beaucoup moins efficace que la caséine brute.



- Le chromatogramme 4 (ci-dessous) représente un échantillon de pétrole brut non extrait par l'éther. Les fractions les plus légères y sont présentes. Si on compare avec le chromatogramme 1, la remarque que nous avons formulée à propos de l'extraction et de la concentration de l'extrait est donc justifiée.



L'étude de ces chromatogrammes nécessite une remarque importante : les conditions de travail sont telles qu'il n'est pas question ici d'une élimination des hydrocarbures par l'action des microorganismes marins, car nous avons opéré en eau de mer stérile et avec des flacons bouchés très hermétiquement.

Donc le fait de n'avoir mis en évidence qu'une faible quantité d'hydrocarbures provenant du pétrole brut sur les chromatogrammes 2 et 3 (page 45), implique que lors de l'extraction par l'éther, les gouttelettes d'hydrocarbures émulsionnés recouvertes du "manteau" protéinique n'étaient pas accessibles au solvant.

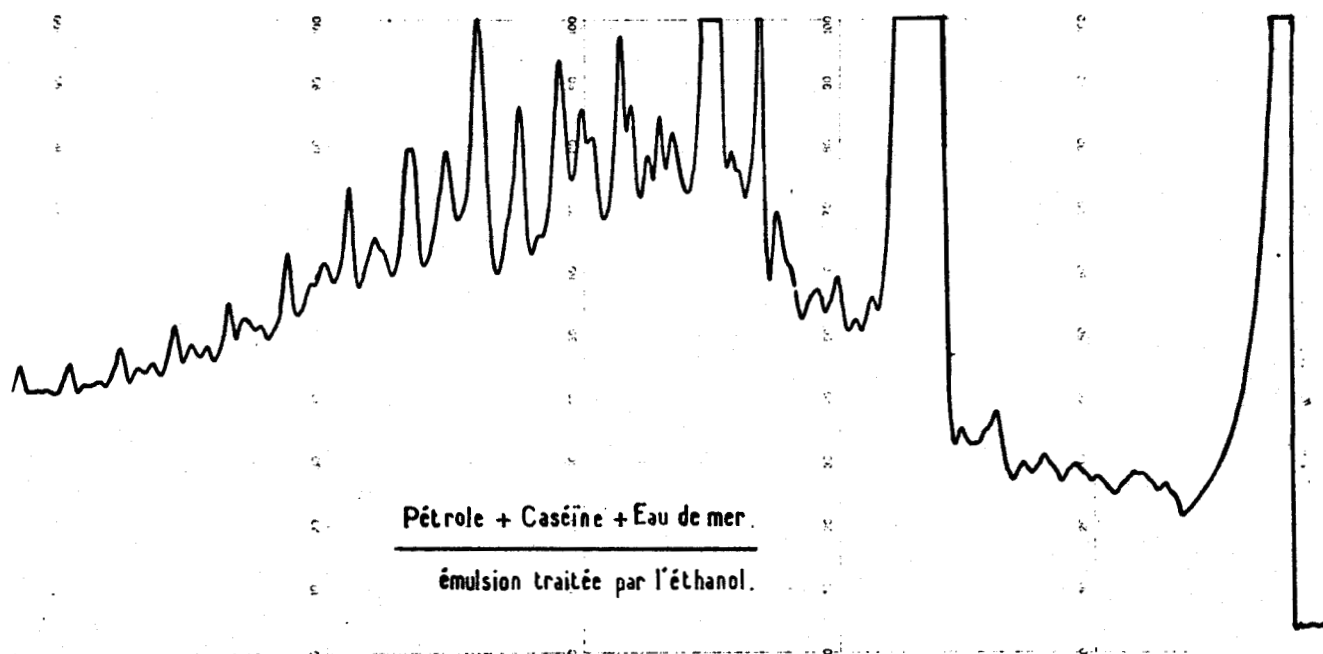
Donc si on cassait cet enrobage protéinique, après extraction, on devrait retrouver un profil de chromatogramme voisin du chromatogramme 1, page (44).

.../

Aussi au lieu de traiter l'émulsion par l'éther diéthylique, nous avons utilisé l'éthanol à 95 %. Nous avons extrait par l'alcool une émulsion pétrole - caséine suivant la même méthode d'extraction que précédemment, l'injection de l'extrait dans le chromatographe s'effectuant en milieu éthéré.

Le chromatogramme 5 de cet extrait alcoolique nous permet de retrouver un profil sensiblement identique à celui du chromatogramme 1. Cela s'explique par le fait que l'éther est un solvant non miscible à l'eau. Comme la coque protéique enrobant la gouttelette d'hydrocarbure est gorgée d'eau - de par les chaînes latérales polaires de la molécule de caséine qui tendent à retenir l'eau adsorbée par la protéine - l'éther ne peut pénétrer à travers cette couche d'hydratation extérieure et cette coque pour extraire l'hydrocarbure prisonnier.

L'éthanol, miscible à l'eau, pénètre facilement à travers cette barrière protectrice et entraîne le pétrole.



2 . DISCUSSION

Il est bien connu que des protéines adsorbées stabilisent des émulsions d'huile dans l'eau.

La présence de membrane protéinique autour de globules lipidiques, dans des émulsions de viande, a été soulignée par de nombreux auteurs : HANSEN (1960) (29), SWIFT et al.(1961) (30) HELMERT et SAFFLE (1963) (31), MEYER et al.(1964) (32), PEARSON et al.(1965) (33).

Dès 1956, COCKBAIN avait étudié l'effet stabilisant de la Sérum albumine bovine sur une émulsion de n décane dans l'eau. Plus récemment, en 1972, les travaux de SABHARVAL et VAKALERIS ont montré en particulier, que la caséine était capable d'abaisser la tension interfaciale d'un mélange huile de palmiste - eau. HENSTRA et SCHMIDT (1970), au cours d'une belle étude de microscopie électronique, ont mis en évidence, dans le lait, que les micelles de caséine et les globules lipidiques séparés avant homogénéisation formaient ensuite un complexe discernable après homogénéisation du lait.

La microscopie électronique a démontré que l'émulsion du pétrole brut par les protéides de mélasses était réalisée par la formation de fines gouttelettes d'hydrocarbures dispersées, au cours de l'agitation mécanique, et enrobées d'une couche hydrophile de protéides.

La chromatographie en phase gazeuse a confirmé le rôle majeur joué par les protéines dans cet enrobage des gouttelettes d'hydrocarbures et dans la stabilité des émulsions réalisées.

.../

A . Explication du rôle joué par la Protéine.

- On peut trouver une première explication du rôle joué par ces protéines dans la stabilisation de nos émulsions pétrole brut - eau, dans les principes structuraux des protéines décrits par KAUZMANN (37). Ces principes concernent l'importance de la disposition des parties hydrophiles et hydrophobes d'une protéine pour sa stabilité. On peut alors facilement admettre que les caséines, qui renferment dans leurs molécules plusieurs chaînes latérales, aient leurs groupements neutres hydrophobes, (Ieu - Ileu - Val etc...) dirigés vers l'hydrocarbure, tandis que leurs groupements chargés négativement et hydrophiles (radicaux hydroxyls - amides - etc...) sont dirigés vers l'eau.

- Ainsi lorsque la couche de pétrole brut est agitée dans une solution diluée de caséine, chaque particule d'hydrocarbure se trouve enveloppée par un film protéinique qui la protège mécaniquement de la coalescence. Les groupements négatifs de la protéine ont tendance à se diriger vers l'eau, donc vers l'extérieur du globule qui se conduit alors comme un corps chargé négativement. Cela donne naissance à des forces de répulsion électrostatiques qui stabilisent l'émulsion. Le tout étant parachevé par la formation d'une couche d'hydratation autour de chaque globule, couche composée d'eau et de groupements hydrophiles dissous.

- L'émulsion plus grossière obtenue avec les protéides de l'adialysable de mélasse d'activité tensio-active plus faible, nous permet d'imaginer que initialement les gouttelettes d'hydrocarbure formées par l'agitation sont relativement petites mais incomplètement recouvertes du matériel protéinique. Aussi, les gouttelettes acquièrent une surface plus importante en coalesçant avec d'autres jusqu'à ce qu'elles aient acquis suffisamment de matériel surfactant pour se protéger de la fusion avec d'autres gouttelettes.

.../

B . Schéma d'adsorption de la Protéine.

En se référant aux travaux de CUMPER et ALEXANDER (38), et suivant nos propres observations, on peut fort bien considérer que l'adsorption de la caséine sur les globules d'hydrocarbures se déroulent en trois stades :

- 1 . Diffusion des molécules de caséine native vers les nouvelles aires interfaciales créées par l'agitation mécanique, et adsorption de la protéine.
- 2 . Dénaturation de la caséine adsorbée provoquée par un déploiement des chaînes polypeptidiques à l'interface gouttelette d'hydrocarbure - eau, avec orientation des chaînes latérales hydrophobes dans la phase pétrole, et des chaînes polaires dans la phase aqueuse de dispersion.
- 3 . Coagulation de la protéine par amalgame des chaînes polypeptidiques déroulées et dénaturées.

COCKBAIN (39), lors de son étude sur l'action stabilisante de la sérum albumine, montre qu'il y a corrélation entre la perte d'activité survenant lors de l'adsorption de la protéine et le degré de déploiement de la molécule. Pour notre part, nous avons observé, 24 heures après le début de l'émulsion, un dépôt de caséine dans le fond du tube à essai ; dépôt qui n'apparaît pas dans un tube dépourvu d'hydrocarbure. Cela tend bien à montrer que la caséine mise au contact de l'hydrocarbure, subit une dénaturation et présente ensuite après déstabilisation de l'émulsion, une perte très marquée de sa solubilité dans l'eau.

C . Analogie avec la Structure de "Type chylomicron".

Dans l'estomac, les graisses sont libérées des aliments par digestion et sont brassées en une émulsion grossière appelée chyme, cette émulsion est délivrée de manière intermittente dans le duodénum où elle est mixée avec des sels biliaires conjugués à la lipase pancréatique. Ensuite, la plupart des triglycérides alimentaires reconstitués entrent dans la circulation générale sous forme de chylomicrons qui seront captés par le foie et les tissus. (JOHNSON - DAVENPORT (40)). Les chylomicrons sont des particules sphériques de 1 000 à 1 100 Å de diamètre, (NICHOLS) (41), suffisamment grandes pour diffuser la lumière et être responsables de l'aspect laiteux d'un sérum recueilli après un repas riche en matières lipidiques.

La structure des gouttelettes que nous avons mise en évidence dans nos émulsions de pétrole brut, nous permet d'établir une analogie avec celle des chylomicrons. Car elles comprennent toutes deux, un noyau huileux important maintenu en suspension par un manteau protéinique essentiel à leur stabilité.

Les chylomicrons renferment, en plus, du cholestérol et des phospholipides qui assurent une meilleure liaison entre le glycéride et le film protéinique (ZILVERSMIT) (42), (SALPETER et ZILVERSMIT) (43).

D'après BIERMAN et coll. (44), ce film de protéines ne représente environ que 1 % de l'ensemble des constituants du chylomicron.

Ce modèle de la structure du chylomicron va nous guider dans les améliorations que nous allons apporter à notre produit émulsifiant pour obtenir une meilleure stabilité de nos émulsions d'hydrocarbures.

3 . CONCLUSION

La microscopie électronique et la chromatographie nous ont permis de comprendre le mécanisme d'action des protéines émulsionnant le pétrole brut.

Ce mécanisme se borne à la formation d'un film de protéine fortement dénaturée enveloppant les gouttelettes d'hydrocarbures formées par agitation. Cette coque protéinique rend les gouttelettes hydrophiles et, les préserve de la coalescence, si bien que tout le système se comporte comme un système libre de pétrole, aussi longtemps que l'action de la protéine est intéressée et efficace.

L'analogie de structure entre les gouttelettes d'hydrocarbures émulsionnées et les chylomicrons, nous a incité à poursuivre nos travaux dans le but d'améliorer les propriétés tensio-actives de la caséine ou de découvrir de nouveaux agents capables d'émulsifier le pétrole brut de façon plus efficace.

CONTRIBUTIONS A L'AMELIORATION
DU POUVOIR TENSIO - ACTIF DES PROTEINES
POUR L'EMULSION DES HYDROCARBURES DANS L'EAU

INTRODUCTION

Nos travaux nous ont permis jusqu'à présent de démontrer que les protéides des mélasses, en enrobant d'une couche hydrophile les gouttelettes d'hydrocarbure, étaient les agents actifs du SEFOIL. Cette propriété n'est pas spécifique des mélasses, nous avons en effet mis en évidence que le sérum albumine, le lactosérum total et, particulièrement les caséines, possédaient un pouvoir émulsionnant plus puissant encore.

La morphologie des gouttelettes émulsionnées, très voisine de celle des chylomicrons et des globules lipidiques du lait, nous a conduit à envisager des améliorations dans la formulation du produit émulsionnant.

Nous avons d'abord pensé adjoindre à la caséine une substance susceptible d'augmenter son efficacité face au pétrole brut.

Puis nous nous sommes intéressés à un nouveau substrat, l'oeuf total, qui, par ses constituants, s'est révélé posséder une très grande capacité d'émulsionner le pétrole. Les constituants tensio - actifs que nous avons ensuite extraits de l'oeuf, nous ont permis de prévoir les modifications qui seront à apporter à la structure même des protéines destinées à lutter contre la pollution par les hydrocarbures.

1 . Recherche d'un agent liant

favorisant l'activité de la caséine

Les résultats des observations effectuées sur les émulsions que nous avons réalisées jusqu'à présent, semblent montrer que le problème principal est de rendre la poudre de caséine encore plus oléophile de façon à augmenter son efficacité face à l'hydrocarbure.

Aussi, en nous fondant sur la structure de la "coque hétéroprotéinique" des chylomicrons et de celle du globule lipidique du lait (THOMPSON et al) (45), nous nous sommes livrés à la recherche d'un liant hydrophobe qui, ajouté à la caséine favoriserait l'attaque de l'hydrocarbure par cette dernière.

I - MATERIEL ET METHODES.

A . Matériel.

Nos essais d'émulsions du pétrole brut dans l'eau, ont été effectués avec des solutions des produits suivants :

- . Caséine totale, isoélectrique, préparée au laboratoire et caséine commerciale.
- . Lactosérum total de vache et sa fraction adialysable.
- . Lécithines commerciales.
- . Cholestérol commercial.

B . Méthodes.

1) Composition des solutions tensio - actives

.../

a) Solutions aqueuses de caséine, de lactosérum et de lécithines à 1 g. pour 100 ml. La dissolution complète de la caséine et des lécithines est assurée en ajoutant 560 mg de phosphate diammonique.

b) Solution aqueuse renfermant, pour 100 ml, 1 g. de poudre de caséine cholestérinée à 50 % suivant le procédé décrit dans Méthodologie (page 91).

La dissolution de la poudre dans l'eau est assurée en ajoutant 750 mg de phosphate diammonique.

2) Critère de tensio activité.

Nous avons été amenés à mettre au point un nouveau critère plus précis de détermination de la tensio - activité des solutions précédentes. (voir protocole expérimental dans Méthodologie, page 86).

Les résultats sont jugés selon la qualité de la dispersion du pétrole dans la phase aqueuse suivant la notation ci-dessous.

Notation 0 . Dispersion négligeable du pétrole. La phase aqueuse est incolore ou à peine trouble. Le pétrole continue à flotter à la surface de l'eau, ou s'est tout au plus fixé sur les parois de l'erlenmeyer. Le temps maximal de décantation totale de la phase hydrocarbure est de l'ordre de 5 minutes.

Notation 1 . Dispersion nette du pétrole avec formation de grosses gouttelettes, plus importantes que celles qui seraient fournies par un dispersant comme le dodécyl sulfate de sodium. L'eau prend d'une manière durable une coloration marron foncé. Cependant, un peu de pétrole non émulsionné flotte encore ou reste collé aux parois de l'erlenmeyer. Le temps de décantation totale de la phase émulsionnée et de l'hydrocarbure encore libre est de l'ordre de 10 minutes.

Notation 2 . Dispersion totale et parfaite du pétrole: Les gouttelettes formées sont très fines et à peine visibles. Le temps de séparation de la phase émulsionnée est supérieure à 60 minutes.

.../

Finalement sur ces différents critères :

- . qualité de la dispersion
- . temps de décantation
- . consistance du "matelas" superficiel

une notation finale est attribuée à chaque solution par rapport à la qualité de l'émulsion obtenue avec la caséine.

II - RESULTATS - DISCUSSION.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau VII ci-après. Ils peuvent être résumés de la manière suivante.

1 . La caséine présente une activité émulsionnante plus importante que celle présentée par la fraction protéidique du lactosérum. Nous avons déjà signalé la finesse supérieure de l'émulsion réalisée par la caséine, par rapport à celles fournies par les protéides du lactosérum de vache et de la sérum albumine bovine. Le Tableau VI (page 36), portant sur l'estimation du taux de participation de chacune des protéines dans la formation du matelas, confirmait cette observation.

Comme les protéides de lactosérum présentent une hydrophilie plus importante que celle de la caséine, et que leur emploi n'améliore pas la tenue de l'émulsion, nous pensons que le caractère hydrophile de la molécule de caséine ne doit pas être augmenté si nous voulons atteindre le but que nous nous sommes fixé : l'amélioration de l'émulsion par la caséine du pétrole brut dans l'eau. On devra par contre chercher à rendre la protéine plus hydrophobe pour favoriser son efficacité d'attaque vis à vis de l'hydrocarbure.

2 . La solution de lécithines possède une activité émulsifiante négligeable vis à vis du pétrole brut dans l'eau. Il semble donc que le film de lécithines autour des gouttelettes d'hydrocarbures ne soit pas suffisamment hydrophile pour stabiliser l'émulsion formée.

Nous savons que les lécithines sont des molécules amphiphiles qui construisent des micelles ou des agrégats macromoléculaires spontanément dans l'eau. ROBINSON (46) et BANGHAM (47).

.../

TABLEAU VII

Activité émulsionnante (déterminée par rapport à
l'activité de la caséine) des différentes solutions vis à vis du pétrole brut
flottant à la surface de l'eau.

Nature de la solution	Notation	Temps de décantation (minutes)	Appréciation finale
Caséine de vache	1	8	+
Protéides de lactosérum	0 - 1	6	±
Lécithines	0	6	Activité négligeable
Caséine + Lécithines	1 - 2	70	++
Caséine cholestérinée	1 - 2	60	++



Cependant au contact de l'hydrocarbure, les micelles ou les aggrégats se transforment et libèrent des molécules de lécithines qui vont se concentrer et s'adsorber à l'interface hydrocarbure - eau, là où leur solubilité est la plus grande. A ce niveau, elles vont alors former une couche structurée, dans laquelle leurs chaînes hydrophobes, plongées dans l'hydrocarbure seront tenues éloignées de l'eau et orientées parallèlement les unes aux autres, leurs chaînes hydrophiles étant seules en contact avec la phase aqueuse.

Si ce mécanisme d'adsorption (voir schéma, page 59) semble idéal pour une bonne dispersion du pétrole brut dans l'eau, la solution de lécithines présente cependant une faible activité émulsionnante. Nous expliquons cela par le fait suivant : les fonctions acide et amine quaternaire des chaînes hydrophiles plongées dans la phase aqueuse, sont ionisées dans un très grand domaine de pH car il s'agit d'une base et d'un acide forts. La molécule de lécithine se présente comme un zwitterion , sans aucune charge nette, car le groupement phosphate est facilement neutralisé par l'ion triméthylammonium. C'est pourquoi, la molécule de lécithine associe certes ses chaînes hydrophobes à la phase hydrocarbure, mais elle ne possède pas un site hydrophile suffisamment important pour associer fortement le globule d'hydrocarbure à la phase aqueuse et stabiliser ainsi l'émulsion.

Ces résultats, que nous venons de discuter, montrent que la présence de groupements hydrophiles et hydrophobes n'est pas suffisante pour produire une émulsion satisfaisante du pétrole brut dans l'eau. Il faut atteindre comme le démontre GRIFFIN (48) à un état de balance hydrophile - lipophile pour le produit émulsionnant. Car si le groupement hydrophile domine la molécule, la structure entière peut montrer peu d'affinité pour le produit à disperser, et si le caractère hydrophobe devient dominant, le produit est insuffisamment orienté vers la phase aqueuse. C'est pourquoi nous avons cherché à atténuer l'hydrophilie de la caséine en la rendant plus lipophile par l'addition de cholestérol d'une part, et de lécithine d'autre part.

3 . Nous constatons que l'addition à la caséine de lécithines et de cholestérol, destinée à imiter la structure de la "coque" hétéroprotéinique des chylomicrons, améliore nettement les propriétés tensio - actives du protéide.

.../

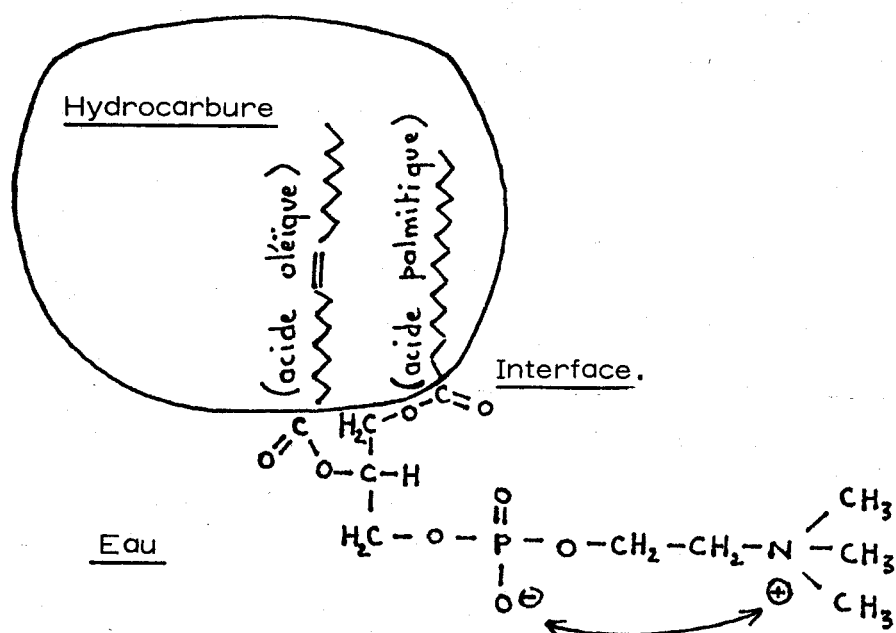


Figure n° 7

Schéma du mécanisme d'adsorption de la molécule de lécithine à l'interface gouttelette d'hydrocarbure - eau

Ce résultat s'explique par le fait que les lécithines et le cholestérol associés à la caséine jouent, grâce à leur caractère amphiphile, le rôle de ligand entre les hydrocarbures et la protéine.

Sous l'interaction puissante de la liaison hydrogène de l'eau, la lécithine associe ses deux chaînes d'acides gras saturé et insaturé à l'hydrocarbure et, contracte par ses pôles hydrophiles (groupement phosphate et amine quaternaire de la choline) des liaisons électrovalentielles importantes avec les groupements chargés de la protéine (ELKES - FRAZER) (49).

La présence de ces liaisons contribue à promouvoir un complexe lipide - protéine rigide qui enserre parfaitement la gouttelette d'hydrocarbure formée par l'agitation et, favorise ainsi sa dispersion dans la phase aqueuse.

La molécule de cholestérol joue également le même rôle stabilisant car par ses groupements hydroxyls, elle se lie aux liaisons peptidiques de la protéine (ADAM) (50).

En nous appuyant sur les travaux de ELEY - HEDGE (51) et FRASER - SCHULMAN (52) et sur nos propres observations, nous pensons que l'adsorption de la caséine, sur la couche lipidique étroitement connectée à la gouttelette d'hydrocarbure, s'exerce très certainement en deux temps. Dans un premier temps, la molécule de protéine se déploie de façon à favoriser les interactions polaires entre ses groupements peptidiques chargés et les terminaisons polaires du lipide, puis une seconde couche de protéine native vient parfaire l'association lipide - protéine et par voie de conséquence l'enrobage de la gouttelette d'hydrocarbure. La structure finale de cette gouttelette que nous définissons (voir schéma, page 61) n'est pas sans rappeler le schéma de membrane cellulaire proposé par DANIELLI et DAVSON (53).

Cette coque lipoprotéinique artificielle, entourant chaque gouttelette de pétrole, annule la lipophilie de l'hydrocarbure et s'oppose ainsi au phénomène de coalescence. Elle permet, en outre, par les groupements chargés présents sur la couche supérieure de caséine, d'associer plus étroitement ces gouttelettes au milieu de dispersion, en contractant avec les ions de l'eau de mer des liaisons qui les stabilisent.

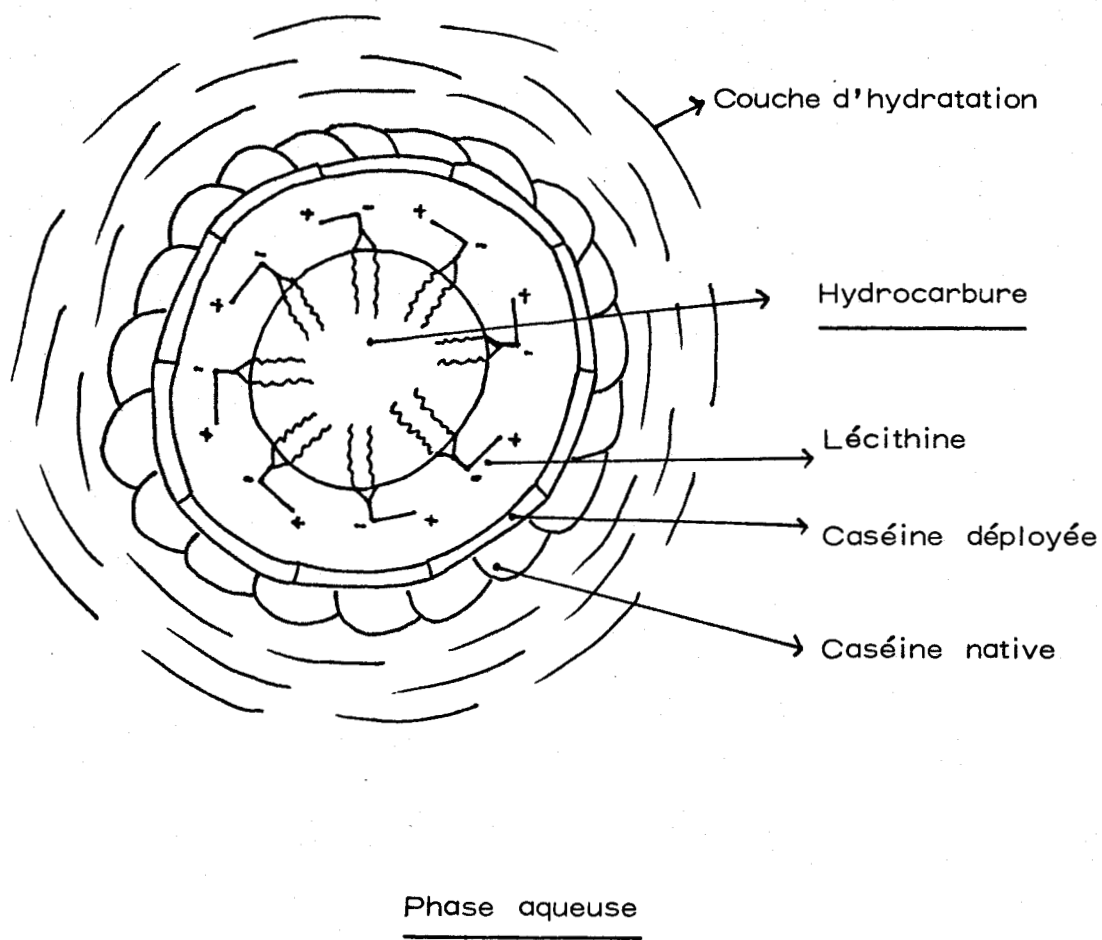


Figure n° 8

Schéma hypothétique de la structure d'une gouttelette d'hydrocarbure
obtenue en émulsionnant du pétrole brut avec un mélange caséines - lécithines

2 . Essai d'un nouveau substrat émulsionnant :

L'Oeuf total.

Nous appuyant sur le résultat des émulsions de pétrole brut obtenues par les mélanges caséine - lécithines et caséine - cholestérol, nous avons recherché un matériel qui possédât à la fois une balance équilibrée entre les caractères hydrophobes et hydrophiles de ses propres constituants.

L'Oeuf total nous est apparu, à cet égard, comme un substrat de choix par la juxtaposition des propriétés hydrophiles des glycoprotéines du blanc et des propriétés hydrophobes des lipides du jaune.

I - MATERIEL ET METHODES.

A . Matériel.

Nos essais d'émulsion du pétrole brut dans l'eau à l'aide de produits d'oeuf, ont été effectués avec les solutions des produits suivants :

- poudre d'oeuf frais, de jaune et de blanc lyophilisés par nos soins.
- poudre commerciale de jaune d'oeuf.

B . Méthodes.

1) Composition des solutions tensio-actives.

- a - Solutions aqueuses à 1g pour 100 ml de poudre d'oeuf total, de jaune et de blanc d'oeuf lyophilisés.

.../

- b - Solution aqueuse de jaune d'oeuf commercial à 1 g pour 100 ml. La dissolution complète de la poudre est assurée par l'adjonction de 560 mg de phosphate diammonique.

2) Réalisation des émulsions.

Nous avons réalisé nos émulsions suivant le protocole expérimental modifié décrit dans Méthodologie page 86 .

Les résultats ont été jugés suivant le même barème de notation que celui employé précédemment.

II - RESULTATS - DISCUSSION.

Les résultats consignés dans le tableau VIII ci-après montrent que les caractères de l'émulsion obtenue par l'emploi de l'oeuf comme agent émulsifiant sont nettement plus satisfaisants que dans les expériences précédentes, la dispersion du pétrole est quasi-totale, le temps de décantation, après l'ultime agitation de 30 secondes, est de l'ordre de 75 minutes.

- L'étude comparée des propriétés tensio-actives du blanc et du jaune d'oeuf, nous permet d'observer que l'activité des protéides du blanc d'oeuf n'est guère supérieure à celle de la caséine, bien que leur caractère hydrophile soit plus prononcé que celui de cette dernière.

Ceci renforce notre hypothèse d'augmenter l'oléophilie de la molécule de caséine pour assurer une meilleure attaque sur l'hydrocarbure.

- Le jaune d'oeuf présente, par contre, des propriétés tensio-actives spectaculaires. Il permet une dispersion parfaite des hydrocarbures, même après une agitation modérée. Le matelas superficiel est très épais et extrêmement consistant. La préparation commerciale de jaune d'oeuf conduit à des résultats identiques.

Réputé comme étant un émulsifiant efficace pour la préparation d'émulsions alimentaires, le jaune d'oeuf contient plusieurs agents émulsifiants tels que les phospholipides, le cholestérol et les protéines.

.../

TABLEAU VIII

ACTIVITE TENSIO - ACTIVE

(Déterminée par rapport à l'activité de la caséine)

DE DIFFERENTS COMPOSANTS VIS A VIS DU PETROLE

Nature de la Solution	Notation	Temps de décantation (en mn)	Appréciation finale
Caséine de Vache	1	8	+
Lécithines	0	6	+ -
Caséine + Lécithines	1 à 2	70	++
Caséine cholestérinée	1 à 2	60	++
Oeuf total	2	75	+++
Blanc d'oeuf	1	11	+
Jaune d'oeuf (+)	2	90	++++



(+) Poudre préparée au Laboratoire et poudre commerciale (GALLIA).

La contribution de ces agents à la formation et à la stabilité des émulsions reste encore mal connue. SELL et al. (54) ont suggéré que c'était un complexe lipide - protéine, plutôt que les lécithines seules, qui était l'agent émulsifiant du jaune. WALDT et al. (55) ont montré qu'une lipoprotéine contenant 33 % de lipides et 65 % de protéines favorisait l'action des oeufs et des émulsifiants dans de nombreux produits alimentaires.

Au vu des observations précédentes effectuées sur nos préparations, nous pensons également que les gouttelettes d'hydrocarbures, que nous formons par agitation en présence de jaune d'oeuf, se retrouvent enveloppées par une couche d'un complexe lipoglycoprotéidique de nature, à la fois, hydrophile et hydrophobe. Ce complexe constitue une barrière de potentiel qui soustrait les composés oléophiles à l'environnement aqueux et expose les groupements chargés à cet environnement, facilitant ainsi la dispersion du pétrole.

III - CONCLUSIONS.

Le choix de l'oeuf s'est donc avéré judicieux, car il vérifie nos déductions antérieures quant au mode d'action du produit émulsifiant face à l'hydrocarbure. Nous avons, en effet, obtenue une émulsion de pétrole brut supérieure à toutes celles préparées auparavant.

Parmi les deux fractions de l'oeuf total, c'est le jaune qui possède ces propriétés tensio-actives spectaculaires vis à vis des hydrocarbures. La coque lipoprotéinique apportée par le jaune d'oeuf, autour de chaque gouttelette, est beaucoup plus puissante et stable que celle que nous avons créée artificiellement en mettant en présence de la caséine brute, des lécithines ou du cholestérol.

3 . Etude du pouvoir tensio-actif du jaune d'oeuf

Propriétés particulières des Lipoprotéines.

Nous avons mis en évidence que les agents tensio-actifs du jaune d'oeuf sont essentiels à une bonne émulsification du pétrole brut dans l'eau. Afin de compléter notre démonstration et dans le but de proposer des modifications structurales à apporter aux protéines destinées à la lutte contre la pollution par les hydrocarbures, il est utile maintenant de situer plus clairement le pouvoir émulsifiant du jaune.

Aussi, avons-nous étudié séparément l'activité tensio-active de chaque constituant du jaune, et chiffré cette activité par des mesures de la tension interfaciale existant dans chacune des émulsions formées.

I - MATERIEL ET METHODES.

A . Matériel.

Nous avons réalisé nos émulsions à partir des différents constituants du jaune que nous avons extraits selon les procédés connus de préparation (voir Méthodologie, page 92).

- . Lipovitelline et vitelline extraite du jaune d'oeuf, par la méthode de ALDERTON et FEVOLD (56).
- . Lipovitellénine préparée selon FEVOLD et LAUSTEN (57).
- . Phosvitine extraite du jaune d'oeuf selon le procédé de MECHAM et OLCOTT (58).
- . Livetine préparée selon la technique de KNIGHT et SCHECHTMAN (59).

Les mesures de tension interfaciale ont été effectuées avec le tensiomètre de DOGNON - ABRIBAT, sur toutes les émulsions réalisées à partir de tous les produits utilisés lors de nos travaux.

.../

B . Méthodes.

1) Composition des solutions réalisées à partir des constituants du jaune.

- a . Solutions aqueuses de lipovitellénine et de vitelline à 1 g pour 100 ml. La dissolution est assurée en ajoutant 560 mg de phosphate diammonique.
- b . Solutions aqueuses à 1 g pour 100 ml de poudre de lipovitelline, de phosvitine et de livetine.

2) Réalisation des émulsions

Elle s'est effectuée suivant le protocole décrit dans Méthodologie page 86 .

3) Mesure de la tension interfaciale des différents systèmes pétrole - eau.

a . Rappels théoriques.

Les molécules individuelles dans un liquide, le pétrole par exemple, s'attirent mutuellement dans toutes les directions, de sorte qu'aucune tension ne peut se créer au sein du liquide. Par contre les molécules d'hydrocarbures, au contact de l'eau, ne peuvent être attirées que dans une seule direction. Ceci crée à la frontière entre les deux liquides, une discontinuité qui se traduit par une tension A appelée tension interfaciale.

Les travaux de SCHULMAN - MONTAGNE(60) montrent que le rôle de l'agent tensio-actif est de supprimer la discontinuité entre les deux liquides, par ses propriétés à la fois hydrophiles et oléophiles qui assurent la liaison entre les phases non miscibles.

.../

b . Principe de la manipulation.

Lorsqu'un corps mouillable est mis en contact avec un liquide, les forces de tension superficielle tendent à le faire pénétrer à l'intérieur du liquide. C'est ainsi qu'une lame de platine pur spécialement dépolie de longueur l sera aspirée vers l'eau, après avoir été mise en contact avec elle, avec une force égale à $2 l A$.

Sur ce principe, DOGNON - ABRIBAT ont mis au point une méthode de détermination de la tension interfaciale, en utilisant une lame de platine solidaire d'un levier dont on rétablit l'équilibre par un couple électromagnétique. Le courant nécessaire au rééquilibrage est mesuré par un milliampèremètre, gradué en milligramme force, qui donne par lecture directe la force F due à la traction de la lame.

On a alors $F \text{ mg} = 2 l A$ soit $A \text{ dynes/cm} = \frac{F \times 0,98}{2 l}$

C'est cette méthode que nous avons utilisée lors de nos manipulations.

c . Mesures expérimentales.

La description de l'appareil et la méthode de mesure suivie sont décrites en détails dans Méthodologie page 87 .

II - RESULTATS - DISCUSSION.

Nous avons rassemblé dans le Tableau IX (page 69) les résultats des mesures de la tension interfaciale de chaque système d'émulsion, ainsi que la notation finale que nous avons attribuée à chaque solution par rapport à la qualité de l'émulsion obtenue avec la caséine.

1 . Les valeurs des tensions interfaciales mesurées, viennent confirmer dans leur ensemble les résultats que nous avons obtenus et chiffrés à l'aide du critère de tensio-activité que nous avons défini. Nous devons cependant formuler trois remarques :

.../

TABLEAU IX

ACTIVITE TENSIO - ACTIVE

(Déterminée par rapport à l'activité de la caséine brute)

DES DIFFERENTES SOLUTIONS UTILISEES POUR EMULSIONNER
LE PETROLE BRUT DANS L'EAU DE MER.

Nature de la Solution	Notation	Temps de décantation (en mn)	Tension interfaciale du système pétrole/solut. en dyne/cm	Appréciation finale
Témoin pétrole/eau	O	0,5	34,6	-
Pétrole-adialysable + eau	0	3,5	28,7	±
Caséine brute de vache	1	8	20,2	+
Lécithines	0	6	12,7	±
Caséine + Lécithines	1 à 2	70	14,3	++
Caséine cholestérinée	1 à 2	60	15,1	++
Oeuf total	2	75	12,0	+++
Blanc d'oeuf	1	11	18,9	+
Jaune d'oeuf	2	90	8,5	++++
Lipovitellines	2	120	9,2	+++++
Lipovitellénine	2	120	8,2	+++++
Vitelline	1	12	19,2	+
Phosvitine	1	9	20,5	+
Livétines	1	12	12,3	±

BUS
LILLE

1) Les mesures ont été effectuées sur des systèmes pétrole - eau de mer. Ceci est à souligner, car la valeur de la tension superficielle de l'eau de mer que nous avons mesurée est de 73,8 dynes/cm tandis que celle de l'eau distillée au laboratoire est de 71,4 dynes / cm.

2) Le témoin pétrole - eau de mer présente une tension interfaciale de 34,6 dynes /cm. Ceci montre que le pétrole brut EDJELE, que nous utilisons, renferme des substances chimiques qui ont déjà tendance à s'adsorber à l'interface et abaissent de ce fait la tension entre les deux liquides.

D'après les travaux de GARRETT - BARGER (61) et SIGWALT (62) ces produits tensio-actifs, qui doivent présenter une structure lipophile - hydrophile, seraient très certainement des amines et des acides naphténiqes.

3) Si la réduction de la tension interfaciale d'un système est présumément l'étape initiale de la formation d'une émulsion, on peut noter que la stabilisation de cette émulsion n'est pas assurée pour autant.

Nous enregistrons en effet, que si les lécithines semblent très efficaces pour diminuer la tension interfaciale du système pétrole - eau, elles ne suffisent pas pour stabiliser les gouttelettes formées lors d'une agitation modérée. Nous avons déjà souligné, par ailleurs, que les groupements des lécithines, qui sont plongés dans l'eau, ne sont pas suffisamment hydrophiles pour que le globule d'hydrocarbure s'entoure d'une enveloppe d'eau et acquiert une charge de surface qui lui permettrait de s'envelopper de couches électriques qui le stabiliseraient dans le milieu de dispersion.

Cette remarque vaut aussi pour la livetine totale, glycoprotéine du jaune (JUKES) (63), dont les protéines contribuent à réduire fortement la tension interfaciale, mais ne stabilisent pas pour autant l'émulsion de façon beaucoup plus satisfaisante que les caséines. La stabilisation des émulsions par la caséine brute étant

due principalement aux propriétés mécaniques du film de protéine dénaturée et non à l'abaissement de la tension interfaciale.

2 . L'analyse du tableau IX nous permet de noter que les propriétés tensio-actives du jaune d'oeuf, vis à vis du pétrole dans l'eau, sont essentiellement liées aux lipovitellines et aux lipovitellénines.

En effet, la vitelline et la phosvitine, de nature phosphoprotéinique comme la caséine brute, possèdent l'activité de cette dernière, tandis que l'activité des lipovitellines et - vitellénines est telle que la quantité de protéides peut être ramenée à 1 g pour 100 g de pétrole sans modifier les qualités de l'émulsion telles qu'elles sont exprimées dans le Tableau IX (page 69) pour un rapport protéides - pétrole de 6 %.

Ces lipoprotéines sont capables de former une coque puissante autour des gouttelettes, créant un fort encombrement stérique qui prévient la coalescence.

3 . Les propriétés particulières des lipovitellines et - vitellénines s'expliquent par le double caractère d'hydrophobie et d'hydrophilie que présentent ces phospho-lipo-glycoprotéines : hydrophobie portée par les longues chaînes d'acides gras des glycérides, des lécithines et des céphalines ; hydrophilie portée par les protéines, par les sucres et par les groupements ionisés des lipides.

Ces complexes lipoprotéiniques du jaune d'oeuf agissent comme donneurs de phospholipides qui s'adsorbent à l'interface gouttelette d'hydrocarbure - eau, et de protéines qui stabilisent l'émulsion rendue possible par la faible tension entre les deux liquides.

D'après COOK (64), ces complexes représentent 85 % de la matière sèche du jaune et se répartissent ainsi :

- 22 % d'un complexe lipovitellénique.
- 78 % d'un complexe lipovitellénique.

.../

La figure n° 9 (page 73) , représentant la composition globale du jaune d'oeuf, permet d'étudier la répartition des lipides et des protéines dans chacun de ces deux complexes.

Nous pouvons ainsi constater que la molécule de lipovitellénine, bien que renfermant environ 2 fois moins de lecithines et de protéines que le complexe lipovitellinique, a une action légèrement plus efficace sur la tension interfaciale du système hydrocarbure - eau ; sans doute la présence dans la lipovitellénine de glycérides neutres, 2 fois plus nombreux permet-elle une meilleure association des phospholipides avec l'hydrocarbure. Cela nous ramène tout droit au schéma de structure du globule lipidique du lait où, d'après KING (65) (voir schéma 10 , page 74) et BRUNNER (66), on trouve une couche de triglycérides à point de fusion élevé située à la périphérie du globule lipidique et associée à une couche de phospholipides polaires connectée étroitement à une couche de protéine.

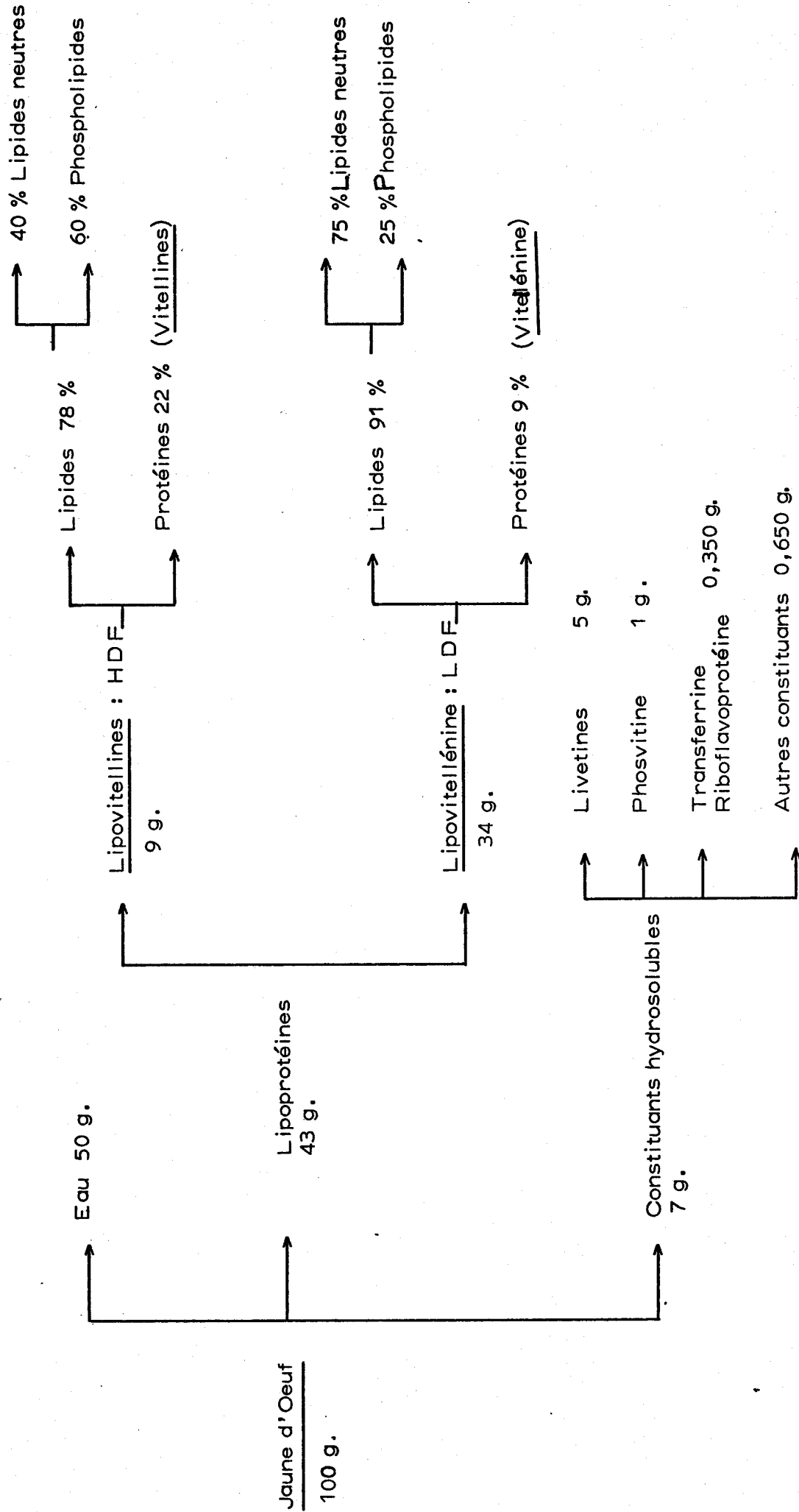
III - CONCLUSION.

Les complexes lipoprotéiniques du jaune d'oeuf sont responsables de l'activité tensio-active spectaculaire de celui-ci sur le pétrole brut.

Des émulsions parfaitement stables de pétrole ont pu être obtenues par agitation modérée en présence de solution aqueuse de lipovitellines et de lipovitellénine.

Les différentes observations effectuées sur nos préparations, nous permettent de penser que les gouttelettes émulsionnées sont constituées d'un "noyau" d'hydrocarbures hydrophobes, dans lequel plongent les longues chaînes polycarbonées des acides gras des fractions lipidiques associées aux glycoprotéides hydrophiles qui se trouvent en position externe et contractent avec l'eau les liaisons qui vont stabiliser l'émulsion.

.../



COMPOSITION GLOBALE DU JAUNE D'OEUF , d'après LEVEAU (67)

Figure n° 9



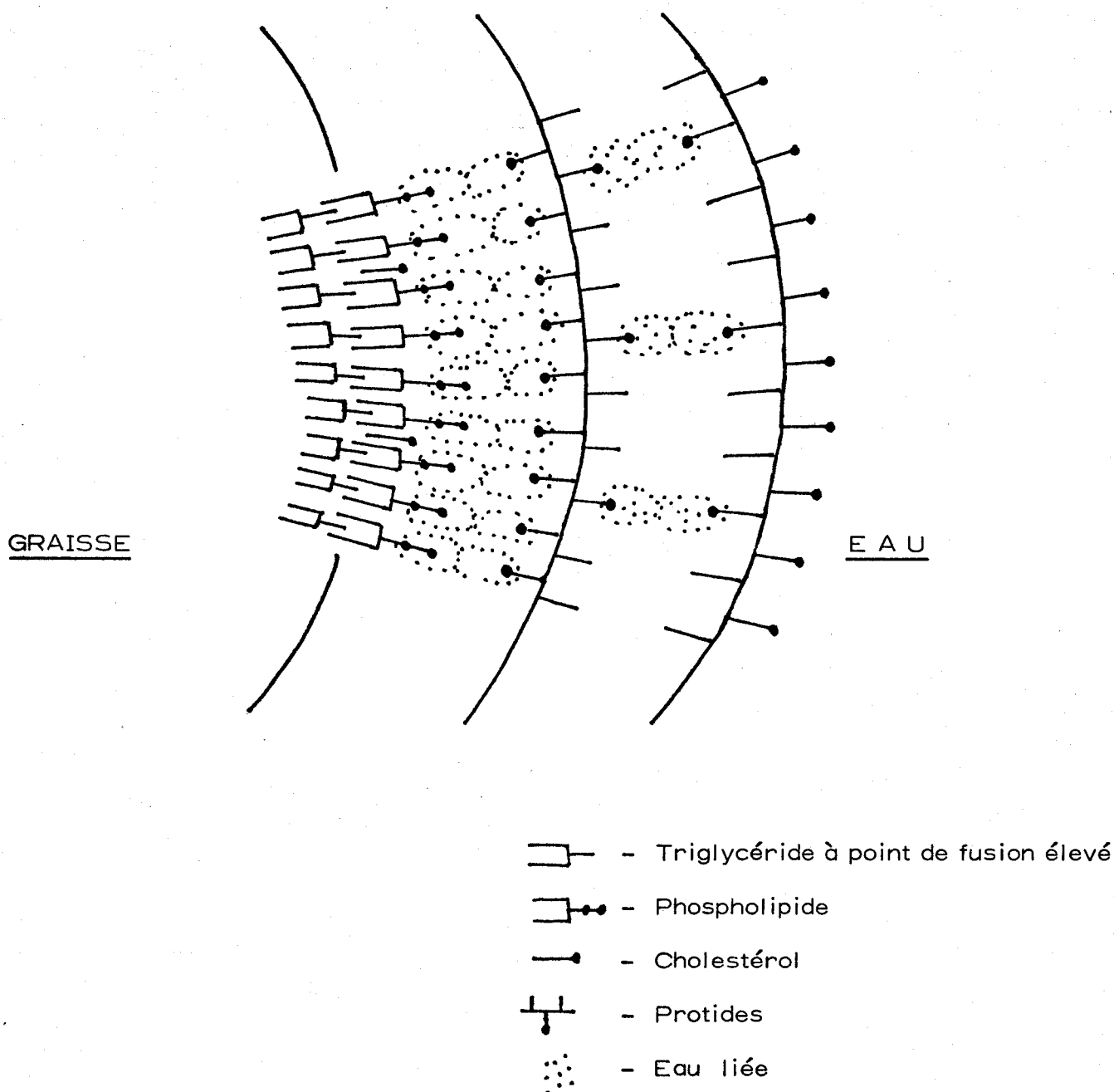


Figure n° 10

Schéma de la structure de la membrane
enveloppant un globule gras. D'après KING (68)



En neutralisant dans un premier temps, avec un faible besoin d'énergie, le pétrole dans l'eau, ces complexes lipoprotéiniques favoriseront dans un second temps son élimination par biodégradation de la coque protectrice et des hydrocarbures prisonniers.

M E T H O D O L O G I E

I . Fractionnement de la mélasse - Etude physicochimique.

A - DIALYSE.

La dialyse à + 4° C pendant deux fois 3 jours d'une solution aqueuse de mélasse à 40 pour 100 contre dix fois son volume d'eau distillée , conduit à 2 fractions.

. Une fraction adialysable, retenue dans les boudins de dialyse, qui renferme les substances de grandes masses moléculaires.

. Une fraction dialysable, filtrable à travers les boudins de cellophane, qui contient les substances de faibles masses moléculaires

Ces deux fractions sont concentrées à l'évaporateur rotatif à 35° C lyophilisées et pesées.

B - FRACTIONNEMENT par CHROMATOGRAPHIE sur ECHANGEUR D'IONS.

6 g. de poudre d'adialysable et de dialysable sont repris séparément par 100 ml d'eau distillée, et les solutions obtenues sont fractionnées par un passage successif sur des colonnes de résines à échange de cations (DOWEX 50 x 8, forme acide) puis d'anions (DUOLITE A 102 D, forme formiate).

1 . Préparation des Résines.

- Avant leur emploi, les résines sont traitées selon le mode opératoire

.../

préconisé par COHN (68) : agitation pendant plusieurs heures, à la température du laboratoire, successivement avec de l'eau, un mélange d'acétone et d'eau (V : V) et de l'acétone. Le traitement est poursuivi avec de l'éther de pétrole, de l'acétone, un mélange d'acétone et d'eau (V : V) puis de l'eau.

- On verse 600 ml de résine dans des colonnes en verre Pyrex de 4 cm de diamètre sur une hauteur de 52 cm. La forme acide de l'échangeur de cations est obtenue par le passage de 1 800 ml d'acide chlorhydrique 3 N, suivi d'un lavage à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH du liquide effluent atteigne 5,5 - 6.

La forme formiate de l'échangeur d'anions est obtenue par le passage de 2 500 ml de soude 3 N, suivie d'un lavage à l'eau distillée jusqu'à ce que le liquide effluent soit neutre, puis passage d'acide formique concentré environ 1 800 ml, suivi d'un lavage à l'eau distillée jusqu'à pH 4,5.

2 . Fractionnement .

100 ml de chaque fraction sont passés sur l'échangeur de cations, puis sur l'échangeur d'anions contenus dans deux grosses colonnes, séparées, mais raccordées à l'aide d'un tube en caoutchouc de façon à ce que le fractionnement s'effectue en une seule opération.

Chaque système de colonnes est ensuite lavé avec 2 litres et demi d'eau distillée. Ces eaux de lavage ajoutées au premier liquide effluent constituent la fraction "neutre", elles renferment les glucides et sont totalement dépourvues de sels minéraux. Les deux colonnes du système sont ensuite déconnectées et traitées séparément par des solutions qui vont déplacer les composés retenus sur la résine. Le passage de 1 500 ml d'une solution aqueuse d'ammoniacale à 8 pour 100 (V : V) fournit une fraction "basique" contenant les acides aminés et les peptides de la mélasse.

La fraction "acide" renfermant les acides organiques de la mélasse est obtenue en traitant l'échangeur d'anions par 1 200 ml d'une solution aqueuse d'acide formique à 10 pour 100.

.../

La fraction acide est ensuite évaporée sous vide à 37° C de façon à éliminer l'acide formique. On concentre ainsi jusqu'à 5 ml de solution, puis on reprend par 40 ml de chloroforme et on évapore de nouveau. Cette opération est répétée 3 fois de façon à éliminer complètement l'acide avant de lyophiliser la solution finale.

La fraction basique subit un traitement identique, mais avec du méthanol pour éliminer l'ammoniaque.

L'effluent neutre de la colonne est lyophilisé directement. Les trois poudres obtenues après lyophilisation sont ensuite pesées.

II . Analyse chromatographique des Fractions.

Les fractions obtenues après dialyse, et passage sur les résines à échange d'ions ont été soumises à des analyses de composition qualitative.

A . COMPOSITION du DIALYSABLE et de ses FRACTIONS.

1) Etude du Dialysable. -----

Elle a été effectuée par chromatographie sur papier Whatman n° 1 pendant 36 heures dans le système solvant de PARTRIDGE (69) : n-butanol/ acide acétique / eau (4 : 1 : 5).

C'est un solvant biphasique que l'on prépare en ampoule à décanter. Après une agitation énergique du mélange, on laisse décanter 20 minutes, puis on recueille la phase inférieure que l'on dépose au fond de la cuve à chromatographie pour la saturer. Cette saturation doit s'effectuer au moins 12 heures avant le début de la chromatographie. La phase supérieure sert de phase mobile. Si elle est trouble, on ajoute quelques gouttes d'un mélange n-butanol/ acide acétique (4 : 1) pour éviter la démixion de la phase mobile au cours de la chromatographie.

A partir d'une solution de dialysable à 10 p. 100, nous avons réalisé des spots de 1 à 10 μ l.

Nous avons caractérisé :

a) Les oses neutres et les osides neutres présents par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (70). On pulvérise sur le chromatogramme un mélange des solutions suivantes :

- . solution aqueuse d'acide oxalique à 2,5 p. 100 : 3 vol.
- . solution alcoolique d'aniline à 2 p. 100 : 2 vol.

On place le chromatogramme à l'étuve pendant 10 minutes à 105° C, les aldohexoses et les cétohexoses donnent des taches brunes, les aldopentoses des taches roses.

b) Les osides renfermant des cétohexoses par le réactif à l'urée chlorhydrique de DEDONDER (71) qui donne une coloration bleu-verdâtre.

On prépare une solution de 5 g d'urée dans 4 ml d'acide chlorhydrique, que l'on complète à 100 ml avec de l'éthanol à 80°.

c) Les acides aminés par trempage avec une solution de ninhydrine à 1 p. 1000 dans le butanol (solution à 1 g. de ninhydrine dans 990 ml de butanol et 10 ml d'acide acétique).

Les acides aminés sont révélés en rouge violacé par chauffage à 105° C pendant 5 minutes. Comme la coloration se dégrade vite à la lumière, on fixe le chromatogramme en pulvérisant le réactif de KAWEREAU (72).

1 ml d'une solution aqueuse saturée de nitrate cuivrique + 0,2 ml d'une solution aqueuse d'acide nitrique à 10 p. 100 dans 500 ml d'éthanol absolu.

Les taches rouge-violacé virent au rouge brique par formation d'oxyde cuivreux.

.../

d) Les acides aminés et les peptides par trempage avec une solution de ninhydrine cadmium à 1 p. 100 dans l'acétone (solution à 1 g de ninhydrine dans 85 ml d'acétone, 5 ml d'acide acétique, 10 ml d'eau distillée + 0,1 g d'acétate de cadmium).

Ce réactif très sensible, révèle en rouge les acides aminés et les peptides, et présente l'avantage de ne pas nécessiter de fixateur.

2) Etude des fractions "neutre" - "basique" et "acide" du dialysable.

Les analyses en oses neutres présents dans les fractions ont été effectuées par chromatographie sur papier en n-butanol / acide acétique / eau (4 : 1 : 5) à l'aide de la révélation à l'oxalate d'aniline.

- La fraction "basique" a été soumise à :

a) Une électrochromatographie bidimensionnelle selon la méthode de BISERTE et coll (73) effectuée dans les conditions suivantes.

- Electrophorèse, dans le tampon de MICHL (74) pyridine / acide acétique / eau (3 : 10 : 487) de pH 3,9 sous une tension de 10 V/cm, pendant 18 heures. Après séchage, les électrophorégrammes sont soumis à la chromatographie dans la seconde dimension.

- Chromatographie dans le système solvant n butanol / acide acétique / eau (4 : 1 : 5) pendant 18 heures. Après séchage, les électrochromatogrammes sont révélés les uns par la ninhydrine 1 pour 1000, les autres par la ninhydrine cadmium 1 p.100.

b) Une chromatographie bidimensionnelle dans les conditions suivantes :

1ère dimension : chromatographie en butanol / acide acétique / eau (4 : 1 : 5).

2ème dimension : chromatographie en phénol / eau.

.../

La chromatographie s'effectue sur papier Whatman n° 1 pendant 36 heures dans la première dimension, puis on laisse sécher une nuit pour éliminer le butanol. On découpe le bas du chromatogramme au niveau du front du solvant pour éliminer les impuretés. Puis on réalise la chromatographie dans la deuxième dimension en solvant phénol / eau.

Le solvant phénol / eau se prépare comme suit :

On verse dans une éprouvette 100 ml d'une solution aqueuse de phénol à 90 pour 100. Cette solution aura été réalisée avec du phénol que l'on aura pris soin de redistiller. Le flacon de cette solution devra être bouché et gardé à l'abri de la lumière car le phénol s'oxyde très vite et devient rose.

On ajoute dans l'éprouvette un même volume d'eau distillée. On transvase doucement dans une ampoule à décanter, on agite faiblement pour éviter de former une émulsion qui serait longue à casser et on laisse décanter.

On recueille la phase inférieure qui va servir de solvant de migration. La phase supérieure est placée dans le fond de la cuve en verre, on y ajoute 3 p 100 d'ammoniaque pure RP et une noix de cyanure de sodium pour complexer les métaux lourds.

On laisse migrer 22 heures en surveillant le front du solvant car la proline migre juste en dessous.

Puis on laisse sécher à température ambiante pendant 24 heures et avant de révéler, on place le chromatogramme à l'étuve pendant une demi - heure à 100° C.

On révèle par une solution de ninhydrine. La ninhydrine réagit avec l' NH_3 pour donner une coloration rose, comme nous avons travaillé en vapeurs ammoniacales, il est nécessaire de bien sécher le chromatogramme avant la révélation, pour que les substances volatils responsables de la coloration parasite soient éliminées.

- La fraction "acide" a été soumise à une chromatographie monodimensionnelle descendante dans le système de MARKAKIS et al.(75) n-butanol / acide formique 3N (1 : 1) pendant 15 heures.

.../

On joint à la phase supérieure (phase mobile) des ions Na^+ (sous forme de formate de sodium 0,05 p 100) pour neutraliser les anions présents et obtenir des spots bien délimités.

Après séchage, les acides organiques présents sont identifiés par pulvérisation sur le chromatogramme d'une solution de bleu de bromophénol (sel de sodium) à 0,05 p 100 dans l'éthanol 50° qui fournit des taches jaunes sur un fond bleu.

B . ETUDE DE LA FRACTION ADIALYSABLE.

La fraction adialysable de mélasse a été étudiée, après une hydrolyse ménagée de sa fraction "sucre", et une hydrolyse chlorhydrique plus poussée de sa fraction protéinique (voir page 21).

1 - L'étude de la fraction oses neutres s'est effectuée par chromatographie descendante sur papier W1 dans le système solvant de JERMYN - ISHERWOOD (76):pyridine / acétate d'éthyle / eau (1 : 2 : 2) pendant 24 heures.

L'emploi de ce système solvant biphasique nécessite l'utilisation d'une cuve en verre que l'on sature par le mélange des deux phases. Avant utilisation, la phase de migration (phase supérieure) est désaturée légèrement par l'addition de quelques gouttes du mélange pyridine / acétate d'éthyle (1 : 2)

2 - Les acides aminés composant la fraction protéinique ont été identifiés par électrochromatographie bidimensionnelle selon la méthode de BISERTE et coll. (77).

3 - Fractionnement de l'adialysable par gel filtration. :

500 mg d'adialysable lyophilisé dissous dans 10 ml d'eau distillée sont déposés, avec une pipette à bout recourbé, au sommet d'une colonne de Sephadex G-50 (3 x 120 cm) gonflé 48 heures dans l'eau distillée, dégazé et stabilisé à température ambiante.

.../

Dès que la solution a entièrement pénétré dans le gel, on chromatographie les composés par passage d'eau distillée préalablement dégazée. Le débit est réglé par une pompe péristaltique et des fractions de 6 ml sont recueillies au collecteur de fractions (débit de 60 ml/heure), l'absorbance de chaque fraction est enregistrée automatiquement à l'aide d'un absorptiomètre en lumière ultraviolette à 254 nm.

On localise la présence des glucides dans les fractions par la méthode au phénol sulfurique de DUBOIS et coll. (78). On procède de la façon suivante : dans des tubes à hémolyse on introduit 0,2 ml de la solution à doser et 0,2 ml de la solution aqueuse de phénol à 5 p 100. Après agitation, on ajoute rapidement 1 ml d'acide sulfurique concentré R P, puis on mesure l'absorbance à 492 nm après avoir agité soigneusement au VORTEX.

C . COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DE LA MELASSE.

Nous avons établi la composition quantitative globale de la mélasse par des méthodes de dosage classique.

1 - Teneur en eau.

On opère en imprégnant par un poids connu de mélasse du sable de fontainebleau que l'on place pour dessiccation à l'étuve à 105° C jusqu'à poids constant (environ 48 h.).

2 - Cendres totales.

5g de mélasse sont introduits dans un creuset de silice et calcinés dans la flamme d'un bec Bunsen. Le creuset est ensuite porté à 550° C pendant une nuit. La réaction est terminée quand on obtient des cendres blanches. Le pourcentage de cendres est alors déterminé par pesée.

3 - Composés azotés.

L'azote total de la mélasse est dosé par la méthode de KJELDAHL après minéralisation sulfurique en présence de catalyseur au mercure. Le taux de protéines de l'échantillon nous est fourni en multipliant le taux d'azote trouvé par le coefficient 6,25.

4 - Lipides totaux.

Nous effectuons une extraction en continu de la mélasse dans un extracteur type SOXHLET pendant 15 heures à l'aide d'un mélange chloroforme - méthanol (70 : 30) (V : V).

L'extrait est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif sous vide (32° C). Le résidu obtenu est purifié par l'hexane, puis l'éther diéthylique. Après filtration dans une capsule tarée, on évapore les solvants sous courant d'azote et le résidu est placé dans un dessiccateur à anhydride phosphorique pendant 24 heures pour éliminer les traces de solvant. Par pesée, on obtient la quantité des lipides totaux.

5 - Fraction "Sucre".

a) Osés totaux.

Ils ont été dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (79) modifiée par RIMINGTON (80). La lecture du dosage s'est effectuée contre une solution témoin de Fructose - Glucose (1 : 1) à 300 μ g/ml.

b) Osés réducteurs.

Nous avons appliqué la méthode au 2,5 dinitrosalicylate.

c) Glucose.

Le dosage du glucose a été réalisé par la méthode au fermcotest SFG qui dose spécifiquement le glucose en présence de protéines et de disaccharides. Cette solution de fermcotest renferme une glucose oxydase hautement purifiée et une substance chromogène qui lors de la libération du glucose par l'enzyme donne une coloration rose dont on mesure l'absorbance à 540 nm.

6 - Fraction minérale.

Les cendres totales reprises par une quantité connue d'HCl 6N nous ont permis de doser les principaux ions minéraux soit par absorption atomique, soit par complexométrie pour le calcium, soit par colorimétrie.

.../

a) Dosage colorimétrique du Phosphore.

Il a été réalisé par la méthode au phosphomolybdate d'ammonium.

b) Dosage du calcium par complexométrie.

A 20 ml de la solution chlorhydrique des cendres totales, on ajoute 1 goutte d'éthanolamine et un comprimé indicateur à base de noir ériochrome T. On chauffe cette solution, puis on lui ajoute 5 ml d'ammoniaque. On titre alors avec une solution millimolaire d'éthylène diamine tétraacétique disodique, l'indicateur passe du rouge au vert au moment du virage.

L'EDTA complexe le calcium et le magnésium, on dose donc par cette méthode la somme de ces deux ions. Connaissant le taux de magnésium obtenu par absorption atomique, on en déduit la quantité de calcium présente dans l'échantillon.

c) Dosage par spectrophotométrie de flamme.

1 . Dosage par émission du potassium et du sodium.

Ces deux éléments chauffés dans une flamme air - acétylène émettent des radiations caractéristiques. L'une d'entre elles nous sert à doser l'élément par l'intensité d'émission de cette raie.

- . Pour le potassium, on se sert de la raie émise à 766,5 nm.
- . Pour le sodium, l'intensité de l'émission est mesurée à 589 nm.

2 . Dosage par absorption du Magnésium et du Fer.

Par exemple pour le dosage du Magnésium, une raie est émise par une lampe spécifique du magnésium lorsque l'on place par nébulisation entre la lampe et le détecteur des atomes de Magnésium, ceux-ci absorbent une partie de l'énergie de la raie, fonction de la quantité de magnésium présent dans l'échantillon de mélasse. Nous déterminons cette quantité en comparant avec une gamme étalon.

III . Etude de l'activité émulsionnante des fractions.

A . TEST EN TUBE A ESSAIS.

1 . Préparation des mélanges émulsionnants.

3,5 g de chacune des fractions obtenues sont traités par 6 ml d'acide phosphorique RP à 85 p 100 ajoutés à 3,5 ml d'eau distillée. On ajoute ensuite lentement 3 g de phosphate bicalcique BILLAULT qualité "vétérinaire" et 1,75 g de phosphate diammonique, en agitant continuellement, le mélange est alors prêt à l'emploi.

2 . Mode opératoire.

Le mode opératoire reproductible est le suivant :

- a - Introduire 2 ml de pétrole brut EDJELE dans un tube à essais.
- b - Ajouter le mélange décrit dans le paragraphe précédent (50 p 100 du poids du pétrole). Agiter à l'aide d'un agitateur de verre pendant 3 minutes.
- c - Ajouter 6 ml d'eau de mer stérile (3 fois le volume du pétrole) Agiter de nouveau pendant 3 minutes.
- d - Agiter encore pendant 1 minute à l'aide d'un agitateur VORTEX (vitesse maximale).

B . TEST EN ERLLENMEYER.

Nous avons adapté la méthode décrite par BEYNON (81).

Le mode opératoire de ce test est le suivant :

Dans un erlenmeyer soigneusement dégraissé avec du chloroforme, puis lavé à l'eau chaude et séché, on verse 10 ml d'eau distillée et 2 ml de pétrole brut. On dépose ensuite à la surface de pétrole, 10 ml de la solution tensio-active.

Après 30 secondes d'agitation manuelle énergique, on note la formation éventuelle de gouttelettes. On verse alors le contenu de l'erlenmeyer dans un tube à essais de 16 mm de diamètre. On agite de nouveau manuellement pendant 30 secondes et on laisse décanter.

On note le temps nécessaire à la décantation des deux phases, ainsi que la consistance du "matelas" superficiel à la fin de la décantation.

C . MESURE DE LA TENSION INTERFACIALE.

Nous avons effectué la mesure de la tension interfaciale de nos différents systèmes pétrole / produit / eau à l'aide du tensiomètre de DOGNON - ABRIBAT.

1) Description de l'appareil.

Le tensiomètre de DOGNON - ABRIBAT comprend 2 parties.

- . Le tensiomètre proprement dit, constitué d'une tête de mesure sur pied support à crémaillère, comprenant un fil de cocon à l'extrémité duquel se trouve accrochée une lame de platine.

- . Le milligrammètre, boîtier métallique avec cadran gradué en milligrammes.

Le tensiomètre est relié au milligrammètre par une fiche polarisée, le courant étant fourni par une pile à 6 éléments de 1,5 V. Avant toute manipulation, le courant de la pile étant coupé, il faut réaliser l'équilibre à vide de la partie mobile du tensiomètre. Pour cela, on place sur la lame de platine, un plateau marqué 200 mg et on règle l'équilibre en faisant glisser le cavalier situé le long du levier. On ajoute le zéro en déplaçant légèrement la graduation du milligrammètre au moyen d'un bouton moleté. L'aiguille doit se trouver sur le trait central de la graduation.

On règle ensuite la sensibilité du milligrammètre en suspendant au crochet portant la lame un petit cavalier de 100 mg. On ferme l'interrupteur et on manoeuvre les boutons du milligrammètre pour rétablir l'équilibre de la partie mobile du tensiomètre. Les caractéristiques de la pile n'ont aucune influence sur cet étalonnage. Le réglage ainsi effectué, ne sera vérifié que toutes les trois manipulations.

.../

2) Préparation des accessoires et des solutions.

a - Nettoyage des accessoires.

Cette opération est essentielle et la qualité des résultats en dépend.

. Toute la verrerie utilisée est lavée au mélange sulfochromique, puis rincée abondamment à l'eau de mer sans aucun contact des doigts.

. La lame de platine est nettoyée et rincée de la même façon, puis portée au rouge, pendant 30 secondes, avant d'être suspendue au crochet supporté par le fil de cocon. Le nettoyage est effectué après chaque détermination.

b - Préparation des solutions.

Dans un bécher propre de 4 cm de diamètre, on ajoute à la pipette 30 ml d'eau de mer stockée dans un flacon bouché, et à la propipette 6 ml de pétrole brut EDJELE. On dépose ensuite à la surface de l'hydrocarbure 30 ml de la solution aqueuse tensio active à 1 p 100 (additionnée ou non de phosphate diammonique).

Après une faible agitation à l'aide d'un agitateur en verre propre pendant 30 secondes, le mélange est recouvert d'un papier aluminium, puis est maintenu à 23° C dans un récipient thermostaté.

On mesure la tension interfaciale du mélange 1 heure après l'agitation.

3) Méthodes de mesure.

Nous avons tout d'abord mesuré la tension superficielle de l'eau

a - Mesure de la tension superficielle (liquide / air)

Nous avons appliqué la méthode dite de la mesure statique. On retire la surcharge de 200 mg qui a servi au réglage, puis on place le bécher contenant 60 ml d'eau de mer sur le plateau mobile. On élève doucement le récipient jusqu'à ce que la surface libre de l'eau affleure le bord inférieur de la lame qui est alors violemment aspirée. On rétablit l'équilibre par la manoeuvre du potentiomètre jusqu'à ce que le bord inférieur de la lame soit dans le plan de la surface du liquide.

.../

Il faut éviter l'arrachement de la lame. S'il se produit, on recommence la mesure. On lit le poids indiqué, auquel on ajoute les 200 mg du cavalier correspondant à la surcharge enlevée.

Cette valeur est multipliée par 0,98 (l'accélération de la pesanteur) puis divisée par 2 fois la longueur de la lame en cm, on obtient la tension superficielle en dynes / cm.

b - Mesure de la tension interfaciale (liquide / liquide)

Le pétrole et l'eau sont deux liquides non miscibles. Le ménisque de séparation des deux phases tourne sa concavité vers le haut. Aussi avons nous opéré des déterminations statiques de la tension interfaciale de nos mélanges avec une lame de platine préalablement mouillée à l'eau de mer.

Le bécher renfermant le mélange décanté pétrole / produit / eau est élevé doucement jusqu'au contact entre l'interface et le bord inférieur de la lame. Celle-ci est brusquement aspirée et la mesure s'effectue comme précédemment. Nous ne tenons pas compte de la poussée d'ARCHIMEDE exercée sur la lame.

Nous avons effectué sur chaque produit 3 mesures de la tension interfaciale. Le résultat noté dans le tableau IX, page 69 est une moyenne des résultats des 3 déterminations.

D . MICROSCOPIE ELECTRONIQUE *

L'émulsion de pétrole - adialysable de mélasse est incorporée dans une solution de gélose à 10p100. On prélève 1 ml de l'émulsion que l'on ajoute à 1 ml de solution gélosée. Après refroidissement, le bloc obtenu est fixé par le formol (solution à 10 p 100). Une nouvelle fixation par l'acide osmique (solution à 2 p 100) suivie d'une déshydratation par l'éthanol absolu et d'une inclusion dans l'épon, permet la préparation de coupes qui ont été observées au microscope électronique Elmskop I Siemens.

* Nous adressons nos vifs remerciements à Monsieur Edmond PUVION, de l'Institut de Recherche sur le cancer de LILLE, pour les observations en microscopie électronique qu'il a bien voulu effectuer sur nos préparations.

E . CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE. *

1 - Appareillage :

Les extraits de pétrole résiduel que nous avons préparé à partir de nos différentes émulsions, ont été chromatographiés sur un appareil PERKIN ELMER équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La chromatographie s'est déroulée dans une colonne en acier inoxydable de 4' x 1/8" remplie de chromosorb W "60 - 80 mesh" traité à l'hexaméthylidisilazane (HMDS) et siliconé à 5 p 100 par de la phase stationnaire SE 30. Avant la chromatographie, la colonne a été mise à conditionner à 260° C pendant une nuit.

2 - Conditions opératoires.

1 ul de chaque extrait a été injecté à 200° C, puis chromatographié sous une programmation de T° C de 2° C/mn de 50 à 240° C, avec un débit de gaz vecteur azote U de 38 ml/mn et détecté à 250° C.

♦ Nous remercions vivement Monsieur Yves LEROY, du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I pour sa précieuse collaboration technique

IV . Méthode de préparation des principaux agents émulsionnants utilisés.

A . PREPARATION DES PROTEIDES DU LAIT.

1 - La caséine brute.

La caséine de vache a été préparée selon la méthode isoélectrique de DUNN (82). Après avoir écrémé le lait de vache par centrifugation à 4000 t/mn pendant 1 h à + 4° C, la caséine brute est précipitée par addition d'acide chlorhydrique jusqu'à pH 4,6 : pH isoélectrique de la protéine. La suspension est ensuite centrifugée, le culot obtenu est lavé avec de l'eau distillée, de l'éthanol, puis de l'éther diéthylique. Le précipité de caséine est ensuite resuspendu dans l'eau distillée et lyophilisé.

La teneur en phosphore des caséines que nous avons préparées n'excède pas 0,84 p 100. Elle a été déterminée par la méthode d'ALLEN (83)

2 - Le Lactosérum.

a . Lactosérum total.

Le lactosérum total est obtenu par lyophilisation de la phase surnageante résultant de la centrifugation effectuée pour obtenir le précipité de caséine.

b . Lactosérum délactosé.

Nous avons délactosé le lactosérum total en le dialysant pendant 3 jours contre de l'eau distillée.

3 - Préparation de la caséine - cholestérinée.

A 1g de caséine on ajoute 40 ml d'une solution chloroformique contenant 1 g de cholestérol. On agite énergiquement le mélange de manière à répartir le cholestérol sur les grains de caséine, puis on laisse reposer pendant 2 heures. Le chloroforme est ensuite évaporé à siccité sous vide à l'évaporateur rotatif avec une faible vitesse de rotation.

.../

Puis la poudre obtenue est étalée en une couche de faible épaisseur dans un plat que l'on place une nuit au dessiccateur.

La dissolution d'1 g de poudre de caséine cholestérinée dans 100 ml d'eau sera assurée en ajoutant 750 mg de phosphate diammonique.

B . PREPARATION des CONSTITUANTS du JAUNE D' OEUF.

1 - Préparation des complexes lipoprotéiniques du Jaune.

a . La lipovitelline brute.

Nous avons utilisé la méthode préconisée par ALDERTON et FEVOLD (84).

Le jaune de l'oeuf est préalablement séparé de la majeure partie du blanc, puis lavé 2 fois à l'eau distillée et séché sur du papier filtre. On craque ensuite la membrane vitelline pour permettre au jaune de s'écouler dans une éprouvette, puis on le dilue avec 2 volumes d'eau distillée. La suspension est ensuite doucement émulsionnée puis centrifugée 1 h à 8000 t/mn à 4° C.

On obtient un culot et une phase liquide. La phase aqueuse est décantée puis mise de côté. Le culot obtenu est un solide cireux contenant la lipovitelline brute et quelques lipides libres. Ces derniers sont éliminés par extraction à l'éther diéthylique dans une ampoule à décanter. La lipovitelline brute est ensuite purifiée par dissolution dans NaCl 10 p100 et précipitée par une dialyse de 48 h contre de l'eau distillée. Le précipité est recueilli par centrifugation, mis en suspension dans l'eau distillée puis lyophilisé.

b . La lipovitellénine.

La phase liquide issue de la première centrifugation renferme le complexe lipoprotéinique de faible densité. Une nouvelle centrifugation de 30' à 10 000 t/mn à + 4° C permet d'éliminer les résidus de lipovitelline récupérés lors de la première décantation.

A partir du nouveau surnageant, nous avons précipité la lipovitellénine en utilisant l'extraction étherée préconisée par FEVOLD et LAUSTEN (85).

.../

Le surnageant est émulsionné vigoureusement en ampoule à décanter avec 2 volumes d'éther diéthylique froid. Après une nuit de repos à + 4° C, nous obtenons une phase étherée supérieure jaune et une phase aqueuse inférieure avec à l'interphase un précipité blanc de lipovitellénine impure. On élimine la phase étherée par aspiration à la seringue, puis la phase aqueuse par décantation. Le précipité est ensuite purifié par plusieurs agitations avec de l'éther froid. La masse gélatineuse jaunâtre que nous obtenons est resuspendue dans l'eau distillée et lyophilisée.

2 . Préparation des Protéides du Jaune.

a - La Vitelline brute.

La vitelline brute partie protéinique du complexe lipovitellinique est obtenue par une extraction continue à l'alcool du complexe selon la méthode de CHARGAFF (86). L'alcool coupe les cénapses et extrait les lipides liés à la protéine.

Avec ce procédé nous avons obtenu, à partir de 1,08 g de lipovitelline brute, 346 mg de vitelline brute.

b - La Phosvitine.

Nous l'avons préparée par précipitation fractionnée aux sulfates de magnésium et d'ammonium selon le procédé de MECHAM et OLCOTT (87).

Le jaune d'oeuf liquide est émulsionné avec 1 volume d'une solution aqueuse de sulfate de magnésium 1,2 M, puis on ajoute 10 volumes d'eau distillée. La suspension est ensuite centrifugée à 8 000 t/mn pendant 2 h à + 4° C. Le précipité obtenu est remis en suspension dans une solution aqueuse de sulfate d'ammonium 0,4 M pH 4, puis agité en ampoule à décanter avec 1 volume d'éther diéthylique stocké à - 20° C. Après un repos de 5 h, nous obtenons :

- une phase supérieure étherée renfermant des lipides.
- un résidu de protéines insolubles.
- une phase hydrosoluble.

.../

La fraction hydrosoluble est décantée puis saturée avec du sulfate d'ammonium. On obtient une précipité que l'on recueille par centrifugation et que l'on redissout dans une solution aqueuse de NaCl 0,25 M. La Phosvitine est ensuite précipitée par dialyse pendant 48 h contre de l'eau distillée, centrifugée et lyophilisée.

Le dosage du phosphore que nous avons réalisé sur la poudre nous montre que la phosvitine renferme une teneur élevée en phosphore : 7,94 %.

C - La Fraction Livétine.

Nous avons appliquée la technique de KNIGHT et SCHECHTMAN (88).

Le Jaune d'oeuf liquide est additionné d'un volume de NaCl 10 p 100. Après homogénéisation, la suspension est extraite à l'éther diéthylique jusqu'à ce que la phase étherée soit incolore. La phase aqueuse décantée est alors dialysée 36 h contre une solution de NaCl à 0,9 % pour éliminer la majeure partie de l'éther. Le contenu du boudin de dialyse est ensuite centrifugé 30 mn à 6 000 t/mn. Le surnageant aqueux est dialysé une seconde fois afin d'éliminer le solvant résiduel, puis après une nouvelle centrifugation, la phase aqueuse surnageante est lyophilisée.

SYNTHESE ET PERSPECTIVES

Nos résultats permettent d'avancer les conclusions suivantes :

1 - Des émulsions parfaitement stables de pétrole peuvent être obtenues par agitation modérée en présence de solution aqueuse (additionnée ou non de phosphate diammonique) de protéides divers, même si le pétrole flotte à la surface d'eau douce ou d'eau de mer.

Le procédé final que nous proposons est nettement plus satisfaisant que celui qui utilise les propriétés tensio-actives des mélasses (procédé SEFOIL) par exemple pour les raisons suivantes :

a . Facilité de préparation des solutions protéidiques qui excluent l'étape préalable du mélange de la mélasse avec des acides et des sels calciques.

b . Réduction considérable de la masse des ingrédients utilisés puisque, dans le procédé SEFOIL, on ajoute un poids du mélange, tensio-actif sensiblement égal à celui du pétrole, tandis que dans notre méthode, on ajoute 5 à 6 p 100. seulement de protéides (1 p.100 dans le cas des lipovitellines et - vitellénines.

c . Contrairement aux procédés utilisant les mélasses qui exigent une agitation préalable avec le pétrole, notre technique est applicable au pétrole aussi bien sur une surface solide que sur de l'eau douce ou sur de l'eau de mer. Le procédé que nous décrivons serait donc particulièrement bien adapté à la pollution des étendues d'eau par les produits pétroliers.

d . L'émulsion en présence de protéides est obtenue facilement par une brève agitation modérée tandis que les mélasses nécessitent une agitation brutale et prolongée.

L'emploi de notre méthode correspond donc à une économie appréciable d'énergie.

.../

e . Les émulsions fournies par les solutions de protéides sont d'une qualité nettement supérieure à celle que donnent les procédés à base de mélasse.

2 - Les observations que nous avons effectuées confirment notre hypothèse de la formation des émulsions sur un schéma de structure identique à celui "des chylomicrons" ou des globules lipidiques du lait dans lequel un "noyau" de lipides hydrophobes est enveloppé par une couche d'un complexe lipoglyco-protéidique de nature, à la fois hydrophile et hydrophobe.

Dans le cas des émulsions de pétrole obtenues avec des lipovitellines et lipovitellénines, on peut imaginer que les gouttelettes sont formées d'un "noyau" d'hydrocarbures dans lequel plongent les longues chaînes polycarbonées des acides gras des fractions lipidiques associées aux glycoprotéides hydrophiles qui se trouvent en position externe et contractent avec l'eau les liaisons qui stabilisent les émulsions.

3 - Les résultats que nous avons obtenus et l'interprétation que nous leur donnons , montrent que les travaux dans le domaine de l'émulsion des produits pétroliers doivent se poursuivre dans le sens de la recherche de composés possédant dans leur molécule à la fois des sites hydrophobes et des sites hydrophiles.

Le greffage sur des protéines, par des procédés d'alkylation, de longues chaînes carbonées hydrophobes pourrait, à cet égard, apporter la solution au problème de la préparation de composés tensio-actifs et biodégradables destinés à lutter contre la pollution par les hydrocarbures.

BIBLIOGRAPHIE

REVUES GENERALES

. Mécanismes de la pollution marine.

- Chimie et Industrie 101 n° 9 (1969) 1 205
- Pétrole Informations 1 172 Février (1971) 29
- Sciences Progrès Découverte 3 431 Mars (1971) 14
- Usine Nouvelle Mai (1971) 68

. Techniques de lutte contre les hydrocarbures.

- Canadian Petroleum 11 N° 8 (1970) 28
- Chemical Engineering 13 Juillet (1970) 40
- Industrie et Techniques Mai (1970) 9
- Journal of the Institut of Petroleum 57 Janvier (1971) 8
- Le Monde 1er Avril (1970) 16
- Marine Biology 1 n° 4 (1967) 322
- Ocean Industry 5 n° 3 (1970) 51
- Ocean Industry 5 n° 6 (1970) 48
- Ocean Industry 5 n° 8 (1970) 35
- Oil and Gas Journal 68 n° 22 juin (1970) 90
- Pétrole Informations 1 150 Avril (1970) 37
- Pétrole Informations 1 152 Mai (1970) 47
- Pétrole Informations 1 156 Juin (1970) 30
- Pétrole Progrès 80 Avril (1969) 26
- Revue I F P 26 n° 9 (1971)
- Usine Nouvelle n° 15 Avril (1970).

AUTEURS

- ADAM . (50)
The Physics and Chemistry of surface Oxford (1941) 81
- ALDERTON.G., FEVOLD.H.L. (56, 84)
Arch. Biochem.8 (1945) 415
- ALLEN,R.J.L. (83)
Biochem.J. 34 (1940) 858
- BANGHAM,A.D. (47)
Advances in Lipid Research 1 (1963) 65
- BERTRAND. A.R.V. (8)
Revue I F P 25 n° 1 (1970) 16
- BEYNON.L.(81)
J of the Institut of Petroleum 57 n° 1 (1971) 1
- BIERMAN.E.L., PORTE Jr. D, O'HARA.D.D., SCHWARTZ.M.,
WOOD Jr F.C. (44)
J. Clin.Invest. 44 (1965) 261
- BIKKERMAN.J.J. (21)
"Surface chemistry : Theory and Applications"
Academic Press New - York (1958)
- BISERTE.G., PLAQUET - SCHOONAERT, BOULANGER.P.
et PAYSANT P. (73, 77)
J. chromatog. 3 (1960) 25.
- BRIANT.J., GATELLIER.C. (10)
Revue IFP 26 n° 9 (1971) 802

- BRUNNER J.R. (66)
J. Dairy Sci. 45 (1962) 943
- CHARGAFF E. (85)
J. Biol.Chem.142 (1942) 491
- COCKBAIN E.G. (34, 39)
J. Colloid Sci. 11 (1956) 575
- COHN W.E., COLOWICK SP, KAPLAN N.O. (68)
"Méthods in Enzymology" Academic Press - New York 3 (1957) 724
- COOK J.W. BURLEY R.W, MARTIN W.G., HOPKINS J.W. (64)
Biochem.Biophys.Acta 60 (1962) 98
- CRAVIOTO - MUNOZ J., JOHANSSON B, SVENNERHOLM L. (23)
Acta.chem.Scand. 9 (1955) 1 033.
- CUMPER C.W.N., ALEXANDER A.E. (38)
Trans.Faraday Soc. 49 (1950) 235
- DANIELLI J.F., DAVSON H. (53)
"The Permeability of Natural Membranes" 2e ed Cambridge - Univ - Press -
Cambridge England (1952)
- DEDONDER.R. (71)
C. R. Acad. Sci. 230 (1950) 997
- DEGOBERT P. (3) (7)
Revue I F P 26 n° 9 (1971) 780
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A.,
SMITH F. (78)
Anal .chem.28 (1956) 350
- DURHAM K. (18)
"Surface Activity and Detergency" Mac Millan and Co, London (1961)
- ELEY D.D., HEDGE D.G. (51)
Disc.Faraday Soc. 21 (1956) 221
J. Colloid Sci. 12 (1957) 401

- ELKES J.J., FRAZER A.C., SCHULMAN J.H., STEWART H.C. (49)
Proc.Roy.Soc. A 184 (1945) 102
- FEVOLD H.L., LAUSTEN A. (57, 86)
Arch.Biochem.11 (1946) 1
- FRASER M.J., SCHULMAN J.H. (52)
J. Colloid Sci. 11 (1956) 451
- GARRETT W.D., BARGER W.R. (5) (61)
Environmental Science and Technology 4 n° 2 (1970) 123
- GATELLIER C., APPERT S. (9)
Revue I F P 21 n° 3 (1966)
- GATELLIER C. (2, 28)
Revue I F P 23 n° 11 (1968)
- GORDON W.G., SEMMET W.F. CABLE R.S., MORRIS M. (26)
J. Am.Chem.Soc. 71 (1949) 3 293
- GRIFFIN W.C. (48)
J. Soc.Cosmetic chemist's 5 n° 4 (1954) 1
- HANSEN L.J. (29)
Food Technol. 14 (1960) 565
- HENSTRA S.,; SCHMIDT D.G. (36)
Neth.Dairy J. 24 (1970) 45
- HELMER R.L., SAFFLE R.L. (31)
Food Technol. 17 (1963) 115
- JENNINGS W.G. (20)
Advances in Food Research 14 (1965) 325
- JERMYN H.A., ISHERWORD F.A. (14) (76)
Biochem.J. 44 (1949) 402

- JOHNSON A.R., DAVENPORT J.B. (40)
Biochemistry and Methodology of lipids (1971)
Wiley - Interscience - Inc. New York
- JUKES T.H. (63)
J. Biol. chem. 103 (1933) 425
- KAUZMANN W. (37)
"Advances in Protein Chemistry" 14 (1959) 1
- KAWEREAU (72)
Nature 168 (1951) 77
- KING N. (65) (68)
"The milk fat globule membrane"
Commonwealth agricultural bureau. Farham Royal Bucks England (1955) 25
- KLEVENS H.B. (29)
J. Amer. Chem. soc. 72 (1950) 3 581
- KNIGHT P.F., SCHECHTMAN A.M. (59), (88)
J. Exp. Zool. 127 (1954) 271
- MARKAKIS.
J. Agr. Food chem. 11 n° 1 (1963) 8
- MATALON R. (30)
Trans. faraday Soc. 46 (1950) 674
- MECHAM D.K., OLCOTT H.S. (58) , (87)
J. Am. Chem. Soc. 71 (1949) 367
- MELLON E.F., KORN A.H., HOOVER S.R. (27)
J. Am. chem. Soc. 75 (1953) 1 675
- MEYER J.A., BROWN W.L., GILTNER N.E., GUINN J.R. (32)
Food Technol. 18 (1964) 138
- MICHL H. (15) (74)
Monatsh Chem. 82 (1951) 489
- MILZ, E.A. (6)
Ocean Industry n° 7 (1970) 40

- NICHOLS A.V. (41)
Proc.Nath.Acad.Sci.US 64 (1969) 1 128
- NITSCHMANN H., GUGGISBERG H. (25)
Helv.chim.Acta 24 (1941) 434
- LEVEAU J.Y. (67)
Thèse Docteur Ingénieur Lille (1973)
- OSIPOW L. , BIRSAN S., SNELL F.D. (19)
J. Am.Oil Chem.Soc. 34 (1957) 34
- PARTRIDGE S.M. (11)
Biochemical Society Symposia Partition chromatograph n° 3 (1949) 52
- PARTRIDGE S.M. (16), (69, 70)
Biochem.J. 42 (1948) 238
- PEARSON A.M. SPOONER M.E., HEGARTY G.R., BRATZLER L.J. (33)
Food Technol. (Chicago) 19 (1965) 1 841
- RIMINGTON C. (13), (80)
Biochem.J. 25 (1931) 1 062
- ROBINSON W. (46)
Trans.Faraday Soc. 56 (1960) 1 260
- SABHARVAL K., VAKALERIS D.G. (35)
J. Dairy Sci. 55 n° 3 (1972) 277
- SALOMONE G.H. (1), (17)
Brevet d'invention, Abrégé descriptif par A. LEMONNIER
- SALPETER M.M., ZILVERSMIT D.B. (43)
J. Lipid Res. 9 (1968) 187
- SCHULMAN - MONTAGNE (60)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 92 n° 2 (1961) 366
- SELL H.M., OLSON A.G., KREMMERS R.E. (54)
Ind. Engchem. 27 (1935) 1 222

- SIGWALT R. (4, 62)
C. R. Acad. Sci. 259 (1969) 561
- SWIFT C.E., LOCKETT C., FRYAR A.J. (30)
Food Technol. 15 (1961) 468
- THOMPSON M.P., BRUNNER J.R., STINE C.M., LINDQUIST K. (45)
J. Dairy Sci. 44 (1961) 1 589
- TILLMANS J., PHILIPPI.K. (12), (89)
Biochem.Z. 215 (1929) 36
- VAN DEN TEMPEL M. (31)
J. Colloid Sci. 13 (1958) 125
- WALDT L.M., DEBRECZENI E.J., SCHWARTZ M., O'KEEFE T. (55)
Food Technol. 17 (1963) 927
- WAUGH D.F., VON HIPPEL P.H. (24)
J. Am.Chem.Soc. 78 (1956) 4 576
- ZILVERSMIT D.B. (42)
Federation Proc. 26 (1967) 1599

