REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIR
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

Faculté de Technologie

Département du Génie des Procédés et Environnement

Mémoire de Fin d'Etudes de Master

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie des Procédés Pharmaceutiques

Thème :

Utilisation du pouvoir catalytique d'une lipase végétale dans la synthèse d'un composé à haute valeur ajoutée.

Présentée par :

- El berkani Nabila
- Abadi Naziha.

Proposé et dirigé par :

Dr. Abouseoud Mahmoud.

Dr. Safha Farida.

Jury :

- Dr. Lettreuch Hichem.
- Dr. Youcef Ettoumi, Khadidja.

Promotion 2023/2024

Remerciement

Tout d'abord nous remercions Allah pour nous avoir guidés vers le chemin de la lumière et pour donner la force, la sagesse, le courage, la santé et la volonté d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à remercier particulièrement mon encadrant académique, Dr. ''Abouseoud Mahmoud'', qui a supervisé cette thèse et pour ses précieux conseils tout au long de la réalisation de cette thèse. Je le remercie également pour son soutien continu, sa présence, sa confiance et sa générosité académique. Nous apprécions beaucoup ses qualités scientifiques et humanitaires.

Nous tenons également à remercier '' Mme Farida Safha'' pour le temps qu'elle nous a accordé, les conseils qu'elle nous a prodigués, son suivi, la patience dont elle a fait preuve à notre égard pendant notre parcours, ainsi que sa gentillesse. Et pour les encouragements que vous nous avez apportés tout au long de ce mémoire.

Nous tenons également à remercier les membres du jury qui ont consacré leur temps à l'étude de ce travail, et ils sont : Dr. Lettreuch Hichem, et Dr. Youcef Ettoumi, Khadidja, Pour nous faire l'honneur de juger notre travail. Merci pour toutes les remarques constructives que vous avez apportées sur ce manuscrit, afin de mieux comprendre certaines des problématiques rencontrées au cours de ce travail de recherche.

Sans oublier d'exprimer notre profonde gratitude à nos chers parents, qui nous ont toujours apporté compréhension, tendresse et amour, et nous remercions nos sœurs et frères, qui ont toujours été à nos côtés, et dont les encouragements ont été d'une grande aide, Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien continu de notre famille et leur éducation basée sur des valeurs morales basées sur le respect d'autrui et du travail.

Nous remercions également nos amis et collègues qui nous ont apporté leur soutien intellectuel et moral tout au long de notre parcours.

Nous remercions tous les membres du laboratoire, qu'ils aient été présents de bout en bout, seulement de passage ou qu'ils soient partis avant moi, Monsieur Zouhir et Mossaab, Madame Fouzia, Khawla, pour leur aider à offrir un environnement de travail adapté et nous fournir les outils nécessaires à la réalisation de cette thèse.

Il est difficile, dans un si petit espace, de remercier toutes les personnes qui ont eu un impact sur notre quotidien pendant toute la durée de notre thèse. Ces personnes se reconnaîtront facilement et sauront à quel point nous sommes affectueux et amicaux à leur égard.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce modeste travail."



Dédicace :

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

Je dédie ce succès à mon moi ambitieux, et surtout à mon moi grand et fort, qui a enduré tous les pièges et a réussi malgré les difficultés. Alhamdulillah avec amour, remerciement et gratitude. Alhamdulillah, grâce à qui j'ai atteint les objectifs les plus élevés. Cela a commencé de manière ambitieuse et s'est terminé avec succès.

A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect, qui a toujours été à mes côtés pour me soutenir, me suivi, m'encourager mon cher père Mohammed, tu as sacrifié beaucoup de choses pour nous, que dieu vous donne une bonne santé et longue et joyeuse vie et que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non âmes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse, elle est ma première supportrice, mon adorable mère Yamina, tu m'as toujours protégé et soutenu, aucun dédicace ne saurait exprimer tous le respect et l'amour que j'ai porte, Merci d'illuminer mes journées.

A mes adorables sœurs Imane, Sarah, Chahinez et mon très cher frère Nour el Dinne, qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur, vous avez toujours là pour moi d'une aide précieuse, Je n'oublierai jamais toutes les fois où vous m'avez réconforté quand j'étais triste, où vous m'avez fourni tout ce dont j'avais besoin et ce que je demandais, et où vous avez été mon soutien et mon refuge. Puisse dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite

A mon cher grand père qui je souhaite une bonne santé et mes tante Houria et Malika et mes cousins Yasmine, Lydia Siradj, Joud que dieu leur donne une longue et joyeuse vie, Aux âmes de mes grand-mères, grand-père et ma tante rabiaa, que Dieu ait pitié d'eux.

A mon meilleur amis asoli, qui est une sœur pour moi, tu es une personne unique. Tu es toujours présent à mes côtés, merci de me motiver lorsque j'en ai besoin. Et aussi mes fidèles amis Asmaa, Chahinez, Manar, Hadil, Manal, Anfel, Aichaa, Amina, Marwa El-nouare, qui m'avez toujours soutenu et encourage durant ces années d'étude et à mes collège que j'ai connu jusqu'à maintient

Sans oublier mon binôme Nabila pour son soutien, sa patience et sa compréhension tout au long de cette mémoire.

Naziha

Dédicace :

Louange à dieu seul,

Ce modeste travail est dédié spécialement

*A ma chère maman **Bahia,** ma raison de vivre, en témoignage de ma reconnaissance pour sa patience, son grande amour et ses sacrifices*

*A mon chère Abi **Zakaria** pour son amour et son dévouement*

« A vous, mes parents, je dis merci d'avoir fait de moi celui que je suis aujourd'hui. Aucune dédicace ne pourra exprimer mes respects, mes considérations et ma grande admiration pour vous. Puisse ce travail vous témoigne mon affection et mon profond amours, merci pour votre grand soutien dans tout, depuis mon enfance jusqu'à la ou je suis ici. »

Je t'aime beaucoup

A mes chères frères Yahia et Souhaib, que je le sais, ma réussite est très importante à leurs yeux, que dieu vous garde pour moi

Sans oublier moi-même, Mercie d'avoir été courageux, très fort, très patient dans ce longue chemin, merci d'être le plus gentille et le plus douce même avec de nombreux obstacles.

A mon futur mari, il verra à quel point sa femme a réussi.

A mes amis, mes tous enseignants depuis le primaire et pour ceux qui m'ont donné de l'aide un jour, que dieu vous paye pour tous vos bienfaits,

Sans oublier mon meilleur binôme Naziha pour son entente et sa sympathie et pour leur aides et supports et sa patience et compréhension tout au long de ce projet

Pour finir, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment, je dédie ce mémoire.

Nabila

الملخص :

الهدف من هذا الجزء هو تسليط الضوء على القوة التحفيزية للبياز النباتي المستخرج من بذور الخروع في تصنيع مركب ذو قيمة مضافة عالية.

تتكون المنهجية من استخلاص الإنزيم وتنقيته وتعبئته في شكل ثابت. وبعد ذلك، سيتم اعتماد طريقة التحسين بهدف اختيار الظروف الأكثر ملائمة للحصول على أقصى عائد من عملية أسيلة السكر بواسطة الأحماض الدهنية.

ركزت التجارب على تخليق أستر السكروز في الأسيتون. تمت دراسة تأثيرات العوامل المختلفة (درجة الحرارة، نشاط الماء، النسبة المولية لحمض السكروز/حمض الأوليك والوقت) على تخليق أوليات السكروز من خلال تغيير عامل واحد في كل مرة. تم الحصول على أقصى عائد لتحويل حمض الأوليك (68 %) في ظل الظروف المثلى: درجة الحرارة (50 درجة مئوية)، النسبة المولية لحمض الأوليك/السكروز (1/1)، النشاط المائي (0.24)، سرعة التحريك (400 دورة في الدقيقة، وزمن رد الفعل (2 ساعة). تم تأكيد الخصائص الهيكلية لأوليات السكروز من خلال تحليل (FT-IR الأشعة تحت الحمراء لفوريه).

بمجرد تحديد الظروف المثالية لتفاعل التركيب، يتم عزل منتجات التركيب وتنقيتها بحيث يمكن تحديد الخصائص الهيكلية والوظيفية لأسترات السكر. يمكن ان يقلل أوليات السكروز من التوتر السطحي للماء من 72 الى 41.9 م ن /م، عند التركيز 0.008 غرام /لتر، يبلغ HLB من أوليات السكروز 13.24، لذلك فهو مستحلب زيت في الماء H/Eوكنتيجة لذلك أوليات السكروز عبارة عن رغوة منخفضة ومستحلب جيد.

كان مؤشر الاستحلاب لمستحلب زيت الزيتون في محلول أوليات السكروز (1:9، حجم/حجم) لمدة 24 ساعة 70%. بقيت مؤشرات الاستحلاب لمستحلب زيت الزيتون في محلول أوليات السكروز ثابتة تحت تأثير درجات الحرارة المختلفة التي شملت ما بين (20 درجة مئوية إلى 100 درجة مئوية)، لذلك يمكننا القول إن منتجنا مقاوم للحرارة .وعند درجة الحموضة قاعدية من 9 إلى 12. بينما كلوريد الصوديوم قادر على زيادة مؤشرات الاستحلاب لمحلول أوليات السكروز 0.1 جم/لتر.

تم استخدام المنتج، أوليات السكروز، بنجاح كمستحلب في تركيب المايونيز يدون بيض.

الكلمات المفتاحية: أوليات السكروز، الخروع، الليباز المثبت، الأسترة، مؤشر الاستحلاب.

Résumé :

L’objectif de cette partie est de mettre la lumière sur le pouvoir catalytique d’une lipase végétale extraite à partir de graines de « *Ricinus communis* » dans la synthèse d’un composé à haute valeur ajoutée.

La méthodologie consiste à extraire l’enzyme de la purifier et de la conditionner sous forme immobilisée. Par la suite, une méthode d’optimisation sera adoptée dans le but de

sélectionner les conditions les plus favorables pour obtenir un rendement maximal du processus d'acylation du sucre par l'acide gras.

Les expériences ont porté sur la synthèse d'un ester de saccharose dans l'acétone. Les effets de différents paramètres (température, activité de l'eau, Rapport molaire saccharose/acide oléique, le temps) sur la synthèse de l'oléate de saccharose, ont été étudiés en faisant varier un facteur à la fois. Le rendement maximal de conversion d'acide oléique (68%) a été obtenu dans les conditions optimisées : température (50 °C), rapport molaire saccharose/acide oléique (1: 1), activité de l'eau (0,24), vitesse d'agitation (400 rpm) et le temps de réaction (2 h). Les caractéristiques structurales de l'oléate de saccharose ont été confirmées par une analyse par FT-IR. Une fois les conditions optimales pour la réaction de synthèse déterminées, les produits de synthèse (oléate de saccharose), sont isolés et purifiés afin que les caractéristiques structurelles et fonctionnelles puissent être déterminées.

L'oléate de saccharose pourrait réduire la tension superficielle de l'eau de 72 à 41 ,9 mN/m avec une CMC de 0,008g/L. Le HLB de l'oléate de saccharose est 13,24, donc il est un émulsifiant dans H/E. Cela détermine que l'oléate de saccharose est un faible moussant, et bon émulsifiant.

L'indice d'émulsification d'une émulsion Huile d'olive dans la solution oléate de saccharose (1:9, v/v) pour une durée de 24 heures était de 70%.

Les indices d'émulsification d'une émulsion huile d'olive dans la solution oléate de saccharose sont restés stables sous l'effet de différentes températures qui comprissent entre (20°C à 100 °C), donc en peut dire que notre produit est thermostable. La stabilité chimique a été aussi vérifiée à des pH alcalins de 9 à 12. Tandis que la présence de chlorure de sodium ($NaCl$) est capable d'augmenter les indices d'émulsification de la solution de l'oléate de saccharose.

Le produit, oléate de saccharose, a été utilisé avec succès dans la formulation de mayonnaise sans œufs.

Mots clés : Oléate de saccharose, Lipase immobilisée, *Ricinus communis*, Optimisation, Esterifiction, Indice d'emulsification.

Abstract:

The aim of this section is to shed light on the catalytic power of a plant lipase extracted from « *Ricinus communis* » seeds in the synthesis of a high added value compound.

The methodology consists of extracting the enzyme, purifying it and conditioning it in immobilised form. Subsequently, an optimisation method will be adopted with the aim of selecting the most favourable conditions for obtaining maximum yield from the process of acylation of the sugar by the fatty acid.

The experiments focused on the synthesis of a sucrose ester in acetone. The effects of different parameters (temperature, water activity, sucrose/oleic acid molar ratio, time) on sucrose oleate synthesis were studied by varying one factor at a time. The maximum oleic acid conversion yield (68%) was obtained under optimised conditions: temperature (50°C), sucrose/oleic acid molar ratio (1:1), water activity (0.24), stirring speed (400 rpm) and reaction time (2 h). The structural characteristics of sucrose oleate were confirmed by FT-IR analysis.

Once the optimum conditions for the synthesis reaction had been determined, the product (sucrose oleate) was isolated and purified so that its structural and functional characteristics could be determined.

Sucrose oleate could reduce the surface tension of water from 72 to 41.9 mN/m with a CMC of 0.008g/L. The HLB of sucrose oleate is 13.24, so it is an emulsifier in O/W. This determines that sucrose oleate is a low foamer, and a good emulsifier. The emulsification index of an olive oil emulsion in sucrose oleate solution (1:9, v/v) for 24 hours was 70%.

The emulsification indices of an olive oil emulsion in sucrose oleate solution remained stable under the effect of different temperatures ranging from 20°C to 100°C, so we can say that our product is thermostable. Chemical stability of emulsions was also verified at alkaline pH levels of 9 to 12. The presence of Sodium chloride (NaCl) increases the emulsification index of the sucrose oleate solution.

The product, sucrose oleate, has been successfully used in the formulation of egg-free mayonnaise.

Keyword: Sucrose oleate, Immobilized lipase, *Ricinus communis*, Emulsification index, Optimization esterification.

Sommaire

RESUME
REMERCIEMENT
SOMMAIRE
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUX
ABREVIATIONS
INTRODUCTION GENERALE 1

Chapitre 01

I. LA LIPASE 4
I.1 Définition: ..... **Error! Bookmark not defined.**
I.2 Classification de lipase: 4
I.2.1 Tyopséléctivité: 4
I.2.2 Regioséléctivité: ..... **Error! Bookmark not defined.**
I.2.3 L'énantiosélectivité: ..... **Error! Bookmark not defined.**
I.2.4 La chimio-sélectivité: 5
I.3 Structure et mécanisme de lipase : 6
I.4 Sources de lipases: 9
I.4.1 Les lipases végétales: 9
I.4.2 Lipases de mammifères: 11
I.4.3 Lipases microbiennes: 12
I.4.4 Les cutinases: 13
I.5 Substrats hydrolysés par la lipase : 14
I.6 Réactions caractéristiques de la lipase : 14
I.6.1 Réaction d'hydrolyse: 14
I.6.2 Réactions de synthèse: 15
I.7 Les caractéristiques des lipases: 20
a. Température: ..... **Error! Bookmark not defined.**
b. Valeur de pH : 20

c. Substrat:..... 20
d. Activité: 21
I.7.1 Les caractéristiques de lipase ricin : 21
I.8 Les applications de la lipase : 22
I.8.1 Applications alimentaires: 22
I.8.2 Applications non-alimentaires: 23
I.8.3 Applications pharmaceutiques: 24
I.9 Immobilisation des enzymes : 25

Chapitre 02

II. EXEMPLE D'APPLICATION DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE PAR LA LIPASE : SYNTHESE DE SUCROESTERS : 27
II.1 Introduction: 27
II.2 Définition de sucroester : 27
II.3 Structure des sucroesters : 28
II.4 Les types des sucroesters : 29
II.4.1 Classification selon le type d'acide gras : 29
II.4.2 Classification en fonction de nombre de groupes hydroxyle du saccharose estérifiés : 32
II.5 Les caractéristiques générales de sucroesters : 32
II.5.1 Propriétés physiques : 32
II.5.2 Autres propriétés : 37
II.6 Synthèse enzymatique des sucroesters: 37
II.6.1 Réaction d'estérification : 38
II.6.2 Réaction de transestérification : 39
II.6.3 Facteurs affectant la synthèse des sucroesters catalysé par la lipase dans un solvant organique : 40
II.7 Domaines d'application des esters de sucres : 46
II.7.1 Applications dans le domaine alimentaire : 46

II.7.2 Applications dans les domaines pharmaceutiques et médicaux : 49
II.7.3 Détergents: ..... **Error! Bookmark not defined.**
II.7.4 Produits cosmétiques 49
II.7.5 Applications comme fongicides et insecticides : 50

PARTIE EXPERIMENTALE.

III. MATÉRIEL ET RÉACTIFS: 52
III.1 MATÉRIEL: 52
III.2 Réactifs: 52
III.2.1 Enzyme: ..... **Error! Bookmark not defined.**
III.2.2 Substrats: ..... **Error! Bookmark not defined.**

PARTIE A: Préparation de la lipase.

III.3 MÉTHODES EXPÉRIMENTALES: 56
III.3.1 Préparation de la lipase: 56
III.3.2 Extraction de la lipase brute : 56
III.3.3 Purification partielle de la lipase : 56
III.3.4 Mesure de l'activité enzymatique : 58
III.3.5 Préparation de la lipase immobilisée : 59
III.4 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS: 62
III.4.1 Mise en évidence de l'activité lipasique : 62
III.4.2 Purification partielle de la lipase: 63
III.4.3 Préparation de la lipase immobilisée 63

PARTIE B: Application de la lipase dans la synthèse d'un sucroester

IV. METHODES EXPERIMENTALES: 66
IV.1 Synthèse d'un sucroester : 66
IV.2 Optimisation de la synthèse d'ester de saccharose : 67
 Mode opératoire de la synthèse : 68
IV.3 Rendement d'acylation : 68

IV.4 Résultats et discussion : 69
IV.4.1 Le choix de solvant : 69
IV.4.2 Choix du sucre adéquat : 70
IV.4.3 Effet du rapport $\boldsymbol{n_{saccharose}}$ /$\boldsymbol{n_{acide\ oléique}}$: 71
IV.4.4 Effet de la température : 73
IV.4.5 Activité de l'eau: 75
IV.4.6 Effet du temps de réaction : 77

PARTIE C: Purification et caractérisation de l'oléate de saccharose.

V. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES: 80
V.1 Caractérisation structurale de l'ester de saccharose : 80
V.2 Caractérisation fonctionnelle de l'ester de saccharose : 80
V.2.1 Détermination de la tension superficielle et la CMC: 80
V.2.2 Détermination de la HLB (Balance Hydrophile- Hydrophobe) : 84
V.2.3 La solubilité: 85
V.2.4 Détermination de l'indice d'émulsification (E24) : 86
V.2.5 Pouvoir moussant: 89
V.2.6 Etude de stabilité structurale et fonctionnelle : 91
V.2.7 Mode opératoire pour la stabilité fonctionnelle: 93
1. Effet de Température : 93
a. Mode opératoire : 93
V.2.8 Caractérisation structurale de l'oléate de saccharose par spectroscopie IR 97

PARTIE D: Applications de sucroesters (Formulation de mayonnaise sans œufs)

VI. GENERALITES SUR LA MAYONNAISE : 100
VI.1 Caractéristiques de la mayonnaise : 100
VI.2 Les ingrédients de mayonnaise : 100
VI.3 Matériel et méthode : 102
VI.3.1 Le but de l'étude : 102

VI.3.2 Matériel utilisé:..... 102
VI.3.3 Les ingrédients alimentaires de la mayonnaise : 102
VI.3.4 Préparation de l'échantillon de mayonnaise: 103
VI.3.5 Analyses sensorielles : 104
VI.3.6 Analyse de la microstructure :..... 105
CONCLUSION
ANNEXE
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Liste des figures

Figures	Pages
Figure I.1 : Réaction d'hydrolyse complète de triglycérides par une lipase non sélective dans un milieu aqueux	**04**
Figure I.2 : Schématisation des réactions catalyser par non-spécifiqueet1, 3 spécifiques lipases	**05**
Figure I.3 : Super imposition des conformations fermées de la lipase.	**07**
Figure I.4 : Représentation de site actif de l'enzyme constitué de serine 153, histidine 264, et l'acide aspartique 177.	**08**
Figure I.5 : Représentation schématique du volet amphiphile et du phénomène d'activation inter-faciale en milieu organique.	**08**
Figure I.6 : Graines et plante de « *Ricin communis* ».	**10**
Figure I.7 : Schématisation de la réaction d'hydrolyse de triglycéride.	**15**
Figure I.8 : Réaction d'estérification directe entre un acide et un alcool.	**16**
Figure I.9 : Schématisation de réaction d alcoolyse.	**17**
Figure I.10 : Schéma représentative de réaction d'acidolyse.	**17**
Figure I.11 : Schéma de réaction d'inter-estification.	**18**
Figure II.1 : Synthèse de sucroesters par : estérification du méthyl glucoside avec des acides gras ou tranésterfication du glucose avec des esters vinyliques d'acides gras.	**28**
Figure II.2 : Structure chimique des esters de saccharose.	**29**
Figure II.3 : Représentation de structure d'un acide gras.	**30**
Figure II.4 : Structure d'un acide gras insaturé.	**30**
Figure II.5 : Structure d'un acide gras poly insaturé.	**30**
Figure II.6 : Représentation d'une émulsion en présence d'un émulsifiant (sucroesters).	**34**
Figure II.7 : Schéma des émulsions : huile dans eau et eau dans huile.	**35**
Figure II.8 : Schéma présentant le sucroester comme agent moussant.	**36**
Figure II.9 : Estérification enzymatique du saccharose.	**39**
Figure II.10 : Trans- estérification enzymatique du lactose.	**40**
Figure III.1 : Protocole de préparation de la lipase de Ricin.	**56**

Figure III.2 : Téchnique de purification partielle de la lipase brute par précipitation à l'acétone.	**58**
Figure III.3 : Étapes d'immobilisation de la lipase dans l'alginate de calcium.	**61**
Figure III.4 : Structure de polymère d alginate de sodium.	**64**
Figure III.5 : Structure des polymères alginate de calcium.	**64**
Figure IV.1 : Schéma de réaction d'estérification de saccharose.	**66**
Figure IV.2 : Montage de synthèse d'ester de saccharose.	**68**
Figure IV.3 : Effet de la nature de sucre sur le rendement d'estérification de l'acide oléique en présence de la lipase de ricin.	**70**
Figure IV.4 : Effet du rapport molaire sur la conversion d'acide oléique par la lipase de ricin.	**72**
Figure IV.5 : Effet de la température sur la conversion d'acide oléique par la lipase de ricin.	**73**
Figure IV.6 : Effet de l'activité initiale de l'eau sur le taux de conversion de l'acide oléique par la lipase de ricin.	**75**
Figure IV.7 : Effet du temps sur la conversion d'acide oléique par la lipase de ricin.	**78**
Figure V.1 : Les tubes de solution tensioactive diluée.	**81**
Figure V.2: Tensiomètre: KRÜSS Gmbh (Germany).	**82**
Figure V.3 : Variation de la tension superficielle d'oléate de saccharose en fonction de la concentration à température ambiante.	**82**
Figure V.4 : La dissolution de l'oléate de saccharose dans de différents solvants.	**85**
Figure V.5 : Emulsion de l'huile d'olive dans l'eau.	**88**
Figure V.6 : Pouvoir moussant de l'oléate de saccharose.	**90**
Figure V.7 : Propriétés fonctionnelles des tensioactifs en fonction de la valeur HLB.	**90**
Figure V.8 : Effet de traitement thermique sur le pouvoir émulsifiant de l'oléate de saccharose.	**92**
Figure V.9 : Les tubes d'émulsine de la solution de l'oléate de saccharose.	**92**
Figure V.10 : Effet de différentes masses de NaCl sur l'émulsion pendant 24 h.	**95**
Figure V.11 : Représentation de l'effet de pH sur la stabilité de l'émulsion (avec émulsification).	**96**

Figure V.12 : Spectre IR d'oléate de saccharose.	**97**
Figure VI.1 : Aspect et texture d'une sauce froide de type mayonnaise.	**100**
Figure VI.2 : Préparation traditionnelle de la mayonnaise.	**101**
Figure VI.3 : L'agitateur et l'homogénéisateur.	**102**
Figure VI.4 : Section longitudinale section transversale de la mayonnaise.	**104**
Figure VI.5 : Microscope optique.	**106**
Figure VI.6 : Vue au microscope de la sauce de mayonnaise.	**107**

Liste des tableaux

Tableaux	pages
Tableau I.1 : Quelques exemples de lipase et leur spécifie.	**6**
Tableau I.2 : Quelques exemples de sources végétales de lipase et leurs applications.	**11**
Tableau I.3 : Exemples de lipases issues de mammifères.	**12**
Tableau I.4 : Certaines espèces microbiennes productrices de lipase	**13**
Tableau I.5 : Comparaison entre le catalyseur homogène et le catalyseur hétérogène.	**19**
Tableau I.6 : Réactions enzymatiques réalisées par la lipase.	**19**
Tableau I.7 : Quelques effecteurs de lipase de « *Ricinus communis* ».	**22**
Tableau I.8 : Exemples d'applications industrielles des lipases.	**24, 25**
Tableau II.1 : Types des sucroesters et leurs utilisations.	**31**
Tableau II.2 : Valeurs de HLB de quelques sucroesters et propriétés.	**33**
Tableau II.3 : Exemples des sucroesters utilisées comme émulsifiants.	**35**
Tableau II.4 : Exemples de quelques micro-organismes inhibés par des esters de saccharose.	**37**
Tableau II.5 : Les avantages et les inconvénients de la synthèse chimique.	**38**
Tableau II.6 : Tableau représente l'influence du solvant organique lors de la synthèse enzymatique.	**42**
Tableau II.7 : Synthèse de palmitate de fructose par différentes lipases.	**43**
Tableau II.8 : Effet de la forme de lipase lors de la synthèse enzymatique de sucroesters.	**44**
Tableau II.9 : Exemples d'esters de sucre produits par voie enzymatique.	**46**
Tableau II.10 : Quelques applications des sucroesters dans le domaine alimentaire.	**49**
Tableau III.1 : Equipements utilisé au cours de l'étude.	**52**
Tableau III.2 : Principales caractéristiques de l'huile d'olive.	**53**
Tableau III.3 : Réactifs chimiques utilisées au cours de la synthèse de surcroester.	**55**
Tableau IV.1 : Représentation des différents facteurs de réaction et leurs valeurs.	**67**

Tableau IV.2 : Résumé des résultats de la synthèse de l'oléate de saccharose	**79**
Tableau V.1 : Solubilité de l'oléate de saccharose dans différents solvants à 25°.	**86**
Tableau V.2 : Effet de température (30 °C, 40 °C) sur la stabilité des émulsions en présences de l'oléate de saccharose pendant 48 h.	**93**
Tableau VI.1 : Différents ingrédients composant la mayonnaise sans œufs.	**103**
Tableau VI.2 : Regroupe les propriétés sensorielles de la mayonnaise.	**104, 105**

Abréviations

AE : Activité Enzymatique.

AL : Activité Lipasique.

a_w : Activité de l'eau.

CAL B : Lipase de Candida antartica B.

CMC : Concentration Micellaire Critique.

DAG : Diacylglycérols

DMSO : Diméthylesulfoxyde.

E/H, (H/L) : Emulsion eau dans huile.

E24 : Indice d'émulsification après 24 heures.

E473 : Esters de sucre.

EEPP : Extrait enzymatique de lipase partiellement purifiée.

EC : Enzyme Classe.

ES : Enzyme substrat.

Eq : Equation.

FAO : Organisation pour l'alimentation et l'agriculture.

FDA : Administration des aliments et des médicaments**.**

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

H/E (L/H) : Emulsion huile dans eau.

HLB : Balance hydrophile – lipophile.

HCl : L'acide chlorhydrique.

HVA : Haute valeur ajoutée.

Ia : Indice d'acide de l'acide gras.

Is : Indice de saponification de l'ester.

KD : Kilo Dalton.

KOH : hydroxyde de potassium.

LPP : Lipase partiellement purifiée.

M : Molarité.

MAG : Monoacylglycérols.

$\boldsymbol{n_{AO}}$ **:** Nombre de moles d'acide oléique.

ne : Nombre de moles d'acides gras de l'essai.

ni : Nombre de moles initiale d'acide gras.

$\boldsymbol{n_{SC}}$ **:** Nombre de moles de saccharose.

nt : Nombre de moles d'acide gras du témoin.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

rpm : Rotation par minute.

T : Température.

TAG : Tri-acylglycerol.

UI : Unité International.

Vol / Vol : Volume/ volume.

INTRODUCTION GENERALE.

INTRODUCTION GENERALE

Le domaine de la chimie verte est en constante évolution, est un défi majeur pour l'avenir, avec une recherche croissante de procédés durables et respectueux de l'environnement. Dans ce contexte, les biocatalyseurs, tels que les lipases végétales, s'imposent comme des alternatives prometteuses aux catalyseurs chimiques traditionnels. Les lipases, enzymes présentes naturellement dans la matière vivante, notamment les végétaux, présentent des propriétés remarquables qui les rendent particulièrement attractives pour la synthèse de composés à haute valeur ajoutée (HVA).

La synthèse de composés HVA est d'une importance cruciale pour divers secteurs industriels, notamment l'agroalimentaire, la pharmaceutique et la cosmétique. Cependant, les méthodes de synthèse traditionnelles souvent employées s'avèrent parfois polluantes, énergivores et génératrices de sous-produits indésirables. L'utilisation des lipases végétales, en abondance dans la nature, offre une solution prometteuse pour sur monter ces limitations et développer des procédés de synthèse plus durables et efficients, techniquement et économiquement et respectueux de l'environnement.

Les lipases présentent souvent une grande spécificité vis-à-vis des substrats. Le pouvoir catalytique des lipases est caractérisé par une fréquence de conversion « turn over number » élevé, l'énantiosélectivité, régiosélectivité et chimiosélectivité vis-à-vis d'une large gamme de substrats. Ces particularités des lipases les rendent intéressantes du point de vue industriel. Les lipases constituent l'une des catégories d'enzymes les plus utilisées pour catalyser l'acylation enzymatique. Le principe de ces biocatalyses repose sur l'utilisation des lipases en milieu pratiquement anhydre ou poly phasique. Une meilleure stabilité des lipases en milieu non conventionnel ou sous des conditions extrêmes est rendue possible grâce à l'immobilisation de l'enzyme par adsorption ou par confinement dans des supports.

Un exemple de réactions biocatalyses par les lipases est l'acylation des sucres. Ce type de réactions conduit à la formation de produits à HVA, appelés « sucroesters ».

Les sucroesters, également connus sous le nom d'esters de sucre, sont des composés obtenus par la réaction chimique entre le sucre et des acides gras naturels ou modifiés catalysée par des enzymes spécifiques en milieu organique. Cette réaction, appelée estérification, modifie la structure du sucre en remplaçant un ou plusieurs groupes hydroxyles (-OH) par des groupes acyles (-COOR), dérivés des acides gras. La structure des sucroesters varie en fonction du type d'acide gras utilisé et de la position des groupes acyles sur le sucre.

Ces molécules, au squelette amphiphile sont constituées d'un groupement osidique hydrophile et d'une chaîne grasse hydrophobe. Cette diversité structurelle confère aux sucroesters des propriétés fonctionnelles uniques.

Les esters de sucre obtenus à partir de ressources naturelles comme matières premières, sont apparus ces dernières années comme une alternative intéressante aux tensioactifs chimiques et comme émulsifiants dans divers secteurs industriels. En plus de leurs propriétés de surface, ils sont biodégradables, ont une faible toxicité et sont peu coûteux par rapport aux molécules issues de l'industrie pétrochimique, puisqu'ils peuvent être obtenus à partir de sources naturelles abondantes sous des conditions de synthèse optimisées.

Cette étude a pour but la mise en évidence du pouvoir catalytique d'une lipase obtenue à partir d'une source végétale (graines de Ricin), comme catalyseur de la réaction d'estérification pour la synthèse d'un sucroester.

Dans ce travail, la première partie sera consacrée à une étude de la bibliographique afin d'identifier le contexte de la recherche il composée deux chapitres

- Le premier chapitre donne un aperçu et des généralités sur la lipase.
- Le deuxième chapitre est consacré à des généralités sur les esters de sucre.

La deuxième partie la partie expérimentale, et les recherches seront menées autour de cinq axes principaux :

- La première approche consiste à préparer de la lipase à partir d'une source végétale les graines de ricin « *Ricinus communis* » et à quantifier son activité catalytique à l'aide d'une réaction d'hydrolyse.
- La deuxième axe consiste immobiliser l'enzyme sur un support pour permettre aux réactions de synthèse des esters de sucre de se dérouler en milieu organique.
- Le troisième axe consiste à évaluer les performances du procédé de synthèse des esters de sucre en étudiant les effets des principaux paramètres opératoires (nature du solvant et des réactifs, ratio réactifs et temps de contact, etc.) sur le rendement de la réaction de synthèse.
- Le quatrième axe de cette section portera sur la caractérisation des produits (esters de sucre), notamment leurs propriétés tensioactives, émulsifiantes et leur stabilité thermique et chimique, afin d'acquérir une compréhension préliminaire de leur domaine d'application industrielle.

- le cinquième axe s'inscrit a la formulation d'une émulsion de la mayonnaise à base de sucroester de l’oléate de saccharose, Ils permettent de stabiliser l’émulsion huile dans l’eau de la mayonnaise en remplacement partiel des émulsifiants naturels présents dans le jaune d’œuf.

Enfin, nous terminons notre travail par une conclusion générale où seront résumés les renseignements tirés de cette étude. Quelques perspectives de développement clôtureront l’étude.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I :
LA LIPASE.

I. LA LIPASE

I.1 Définition :

La lipase est un nom composé du mot (lipide) qui signifie gras et du suffixe (- ase) qui signifie qu'il s'agit d'une enzyme **[1].** Ces enzymes encore appelées triacylglycérolsacyl hydrolases (EC.3.1.1.3). Appartient à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques**.**

Les lipases sont des glycoprotéines extracellulaires hydrosolubles associant un partie sucre et une partie acides aminés. Elles peuvent agir d'une part comme des catalyseurs dans un milieu organique et d'autre part elles peuvent agir en tant qu'hydrolases **[2].**

Elles sont responsables du catabolisme les glycérides insolubles (triglycérides, di glycérides, mono glycérides), leurs substrats préférentiels, en glycérol et en acides gras plus solubles. De plus, certaines lipases sont capables d'hydrolyser des phospholipides, des esters de cholestérol **[4].** Elles sont abondamment présentes dans la nature **[5].**

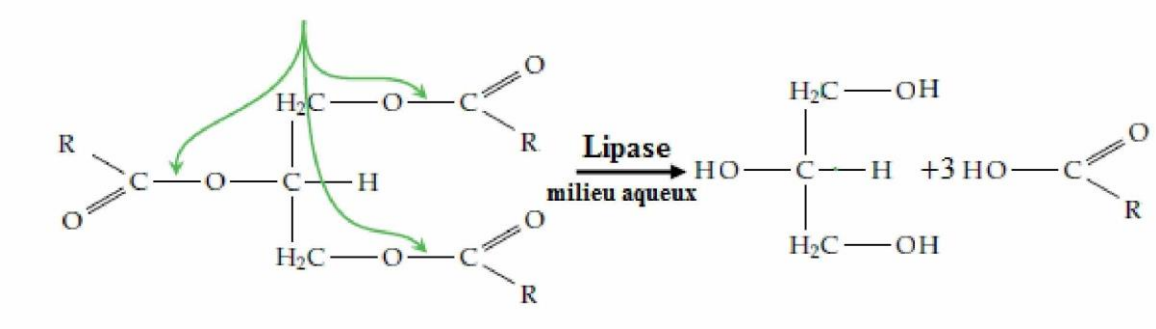


Figure I.1: Réaction d'hydrolyse complète de triglycérides par une lipase non sélective dans un milieu aqueux **[6].**

I.2 Classification de lipase :

Le même type de réaction est catalysé par les lipases, mais leur action sur les substrats en ce qui concerne la chimio-, la régio- et l'énantio- sélectivité diffère considérablement. Les conditions opératoires optimales varient d'une lipase à l'autre, ce qui rend difficile ou même impossible de développer un procédé général adapté à toutes les lipases **[7].**

I.2.1 Tyopséléctivité:

Les lipases sont sélectives ou spécifiques d'un type donné d'acides gras, et ils peuvent également être spécifiques vis- à- vis d'acides gras **[8].**

En général, les lipases sont plus actives sur les triglycérides à chaîne courte ou moyenne que sur les triglycérides à chaîne longue **[7].**

I.2.2 Regioséléctivité :

La Regioséléctivité, ou spécificité de position, représente la capacité à hydrolyser préférentiellement les esters primaires (en position externe sn-1 ou sn-3) ou les esters secondaires (en position interne sn-2) de triacylglycérols **[8].**

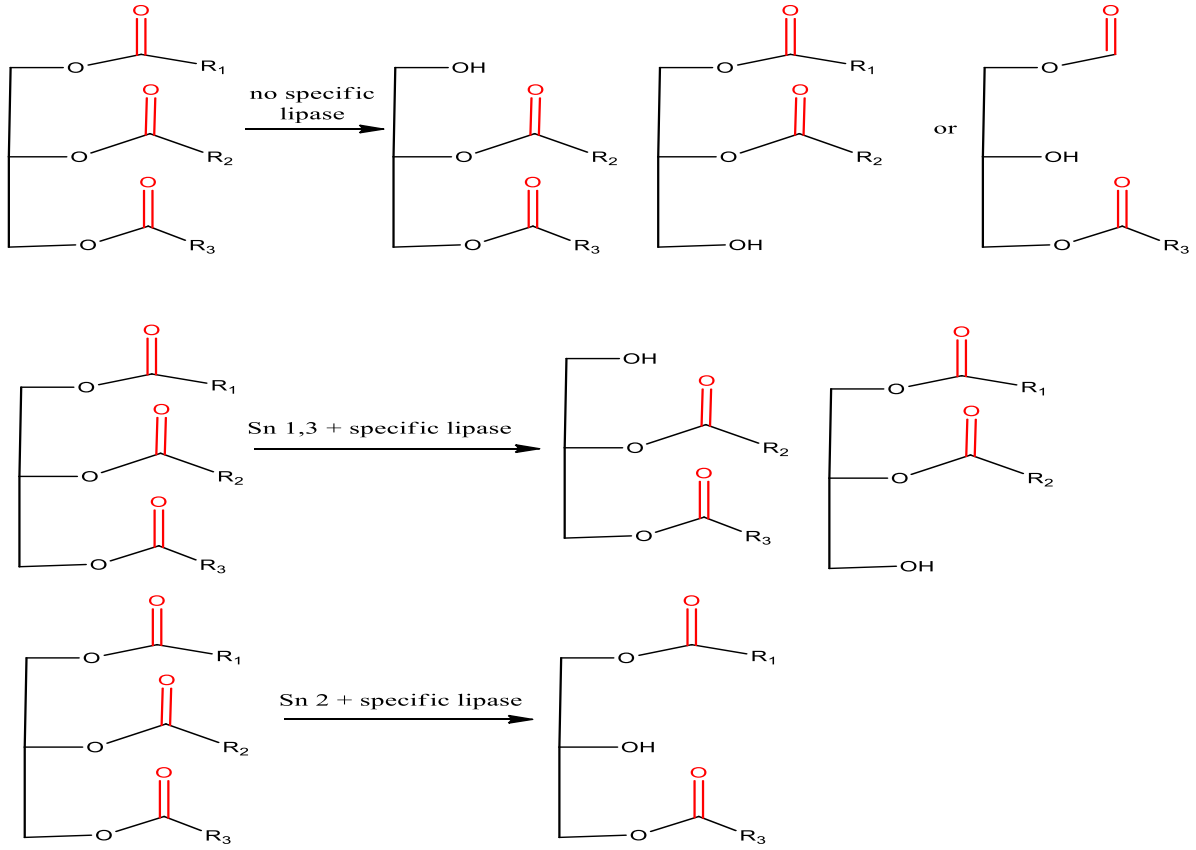


Figure I.2 : Schématisation des réactions catalyser par non-spécifique et (1, 3) spécifiques lipases **[9].**

I.2.3 L'énantiosélectivité :

C'est la capacité de la lipase à différencier les deux énantiomères d'un mélange racémique (1,2- versus 2,3-sn di-acylglycérol) **[6].**

La stéréo sélectivité représente la capacité de distinguer un stéréo groupement hétérotopique mais homomorphe par rapport à un autre (positions sn-1 vs sn-3) **[8].**

I.2.4 La chimio-sélectivité :

La chimio-sélectivité de la lipase fait référence à la capacité de l'enzyme, lipase à catalyser sélectivement une réaction chimique spécifique entre deux ou plusieurs groupes

réactifs dans une molécule. Il a été démontré que les lipases présentent des rapports de chimio sélectivité élevés dans diverses réactions chimiques, telles que les réactions de Trans-acylation et d'acylation. Par exemple, les lipases ont été utilisées pour catalyser sélectivement l'acylation des alcools par rapport aux thiols dans les réactions de Trans-acylation.

La chimio-sélectivité des lipases présente un intérêt dans divers domaines, notamment la biocatalyse et la synthèse organique, où une modification sélective des molécules est souhaitée **[10].**

Tableau I.1 : Quelques exemples de lipase et leur spécifié **[6].**

Spécifié	Exemples
Typosélectivité	L'enzyme de « *Penicillium requeforti* » est spécifique des acides gras à courte chaine
Regioséléctivité	La lipase pancréatique humaine et la lipase de « *Rhizopusarrhizus* » sont régiosléctives vis à vis des esters d'alcool primaires.
Enantiosélectivité	La lipase gastrique est sn-3 stéréospécifique alors que la lipase de « *Rhizmucormiehe* » est sn-1 stéréospécifique.

I.3 Structure et mécanisme de lipase :

Les lipases sont des glycoprotéines dont le poids moléculaire varie de 20 à 60 KD. Le site actif de ces enzymes est constitué d'une triade d'acides aminés hydrophobes situé au point de départ de l'interaction entre l'enzyme et le lipide [**11**].

Les lipases opèrent à l'interface entre les lipides et l'eau. La caractéristique importante de nombreuses lipases est la présence, d'un couvercle de sous domaine mobile situé sur le site actif. Si le couvercle est fermé, le site actif est protégé de l'environnement et inaccessible aux substrats, donc la lipase est inactive.

Dans une conformation ouverte, les substrats peuvent pénétrer dans les sites actifs des lipases et être convertis. Autrement dit, seules les lipases « ouvertes » présentent une activité catalytique. Par exemple, la structure de la lipase de « *Thermomyces lanuginosus* » à été résolue à la fois dans sa conformation fermée et dans sa conformation ouverte. Une comparaison des deux conformations est présentée à **Figure I.3 [12] :**

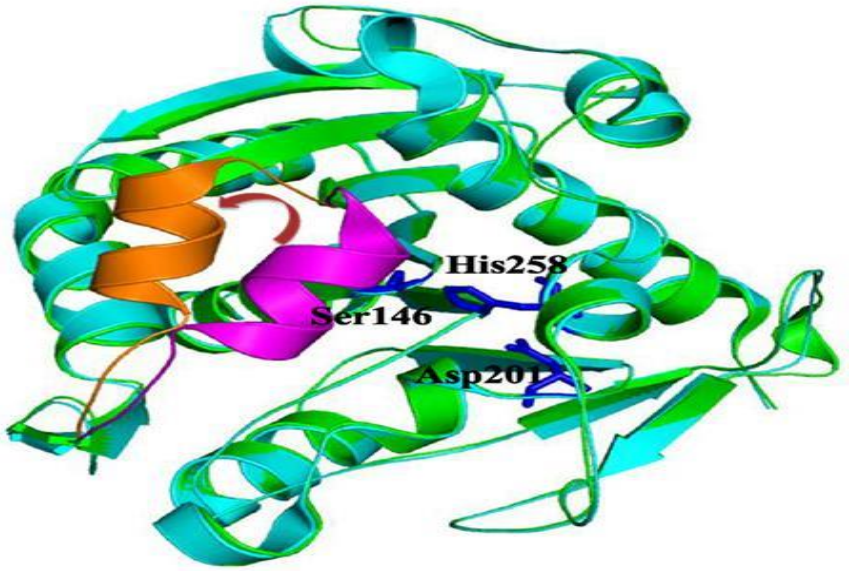


Figure I.3 : Super imposition des conformations fermées de la lipase. (Le couvercle fermé, le couvercle ouvert et les triades catalytiques ont été mis en évidence respectivement par les couleurs magenta, orange et bleue.) **[12]**

Des études plus détaillées ont suivi, montrant que les lipases, quelle que soit leur origine, Partagent de nombreuses caractéristiques structurelles communes. Il s'agit du feuillet *α/β*, De la triade catalytique et du composant amphiphile **[11].** Le site actif de la lipase est constitué de la triade catalytique comportée de :

- La sérine 105, agit comme un nucléophile lors de la formation du premier intermédiaire tétraédrique.
- De l'Histidine 224.
- L'acide aspartique 187 qui stabilise cette dernière.

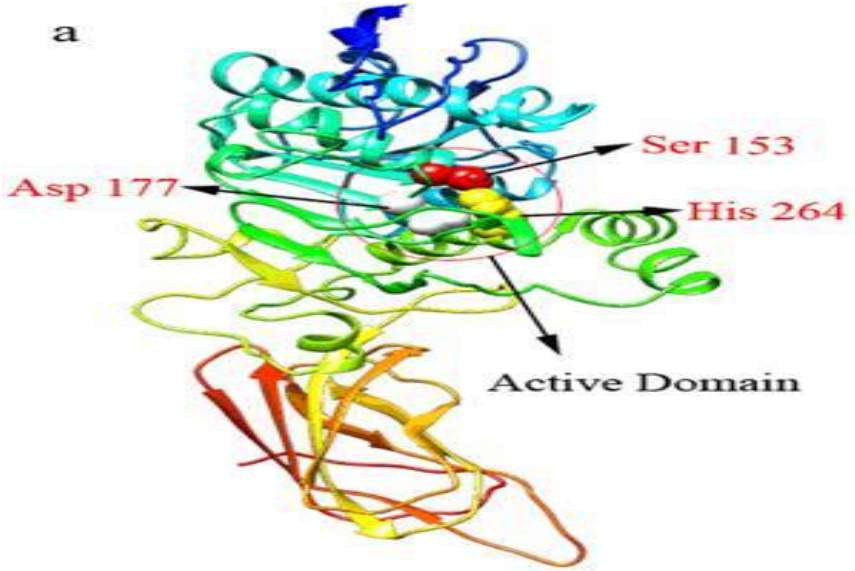


Figure I.4 : Représentation de site actif de l'enzyme constitué de serine 153, histidine 264, et l'acide aspartique 177 **[13].**

En milieu organique, les sites actifs des lipases sont généralement inaccessibles aux solvants. En fait, il est recouvert par une boucle amphiphile appelé volet amphiphile ou « lid »

Il s'agit de la forme bloquée ou inactive de l'enzyme **(Figure I.5)**. Plusieurs auteurs ont démontré l'existence d'une forme ouverte active de cette enzyme. Dans ce cas, la face hydrophobe du lambeau qui faisait auparavant face à l'intérieur du site actif est ensuite exposée au solvant, formant une surface hydrophobe qui devrait interagir avec l'interface lipide-eau **[14, 15].**

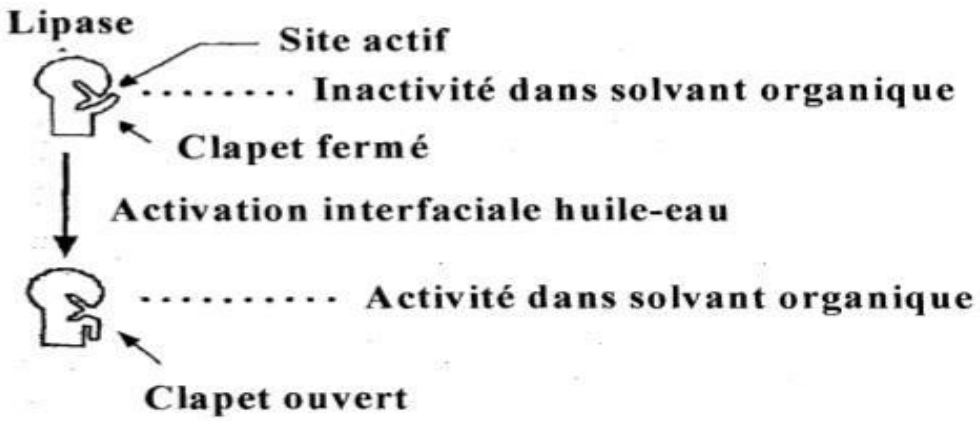


Figure I.5 : Représentation schématique du volet amphiphile et du phénomène d'activation inter-faciale en milieu organique **[16].**

I.4 Sources de lipases :

La nature est riche en lipases qui jouent un rôle physiologique essentiel dans le métabolisme des graisses. Ils se rencontrent à la fois dans le monde végétal, chez les invertébrés et les vertébrés, ainsi que chez de multiples microorganismes. Principalement sous forme de protéines extra cellulaires **[17].**

I.4.1 Les lipases végétales :

Les lipases sont disponibles à partir de diverses parties des plantes (les céréales, les fruits, les feuilles, le latex). La majorité des lipases végétales sont principalement isolées à partir de graines, notamment le ricin, le haricot africain, l'orme, le tournesol, l'amande de coco, le sésame, le sorgho, etc. où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (ou huile de corps), car dans les grains il ya généralement une grande concentration d'huile **[17].**

Une activité de lipase plus élevée est observée dans les graines que dans toute autre source car elles contiennent concentration élevée de triacyglycérols. Cette activité dans les graines de plantes augmente pendant la germination à mesure que les triacylglycérols sont convertis en sucres solubles par l'action de la lipase **[18].**

Les lipases végétales peuvent être classées en trois grands groupes **:**

I.4.1.1 Le premier groupe :

Il est constitué par les triacylglycérols hydrolases qui sont principalement présentes dans les graines. Les lipases végétales peuvent être classées en trois grands groupes. Leur étude revêt une importance économique capitale puisqu'elles sont responsables en grande partie de l'altération des graines pendant le stockage **[17].**

- **Graines de ricin :**

Le terme latin « *Ricinus* » fait référence aux graines qui ressemblent à des tiques gorgées de sang. En latin, « *communis* » signifie « *commun* ». Est une espèce de plantes à fleurs de la famille des Euphorbiaceae **[19]**.

- **Origine :**

« Ricinus communis » Est originaire d'Afrique tropicale et s'est propagé partout où le climat l'a permis. Il est cultivé pour extraire de l'huile dans de nombreux pays chauds d'Arabie, d'Asie, d'Afrique et d'Amérique. Il est également présent dans des conditions

climatiques subtropicales. Il est actuellement présent en tant qu'espèce annuelle spontanée ou en tant que plante ornementale dans les climats tempérés.

On pense que cette espèce est envahissante dans certaines régions, comme l'Australie tropicale **[20].**

- **Historique :**

Les graines de ricin ont été utilisées depuis plus de 6 000 ans. Elles ont été retrouvées dans des tombeaux égyptiens datant de 4 000 avant Jésus-Christ et ont probablement servi de combustible dans les lampes et pour leurs bienfaits sur la peau.

L'huile de ricin, extraite des graines, a été utilisée dans la médecine populaire et dans diverses applications cosmétiques et industrielles**.**

Le ricin a également été étudié au fil des années et son potentiel dans le traitement du cancer a été découvert, car elle peut détruire les cellules cancéreuses sans nuire aux cellules saines du patient **[21].**

- **Identification des grains :**

Le ricin se présente sous la forme d'une plante herbacée, pouvant atteindre 7 m et plus. Il possède des parties telles que les feuilles, les fleurs, et les grains.

Les graines de ricin, « *Ricinus communis* », sont toxiques en raison de la présence du ricin, une protéine glycoprotéique. Le ricin est l'une des toxines les plus mortelles au monde**.** Sont contenues dans chacune des loges du péricarpe, ont presque la forme d'un haricot moyen, sont piriformes, ovoïdes, allongées ou plates, luisantes marbrées de gris rougeâtre et de blanc. Cependant, il est important de noter que les graines de ricin contiennent naturellement de la lipase, une enzyme qui peut être extraite et utilisées dans divers application **[22]**.



Figure I.6 : Graines et plante de « *Ricin communis* » **[23]**

I.4.1.2 Le Second groupe :

Dénommés acyle-hydrolases, sont présents dans divers tissus de la plante. Ces enzymes présentent peu de spécificité pour leur substrat, elles sont incapables d'hydrolyser les triglycérides mais elles peuvent catalyser certaines réactions de Trans-estérification. Les principales acyle-hydrolases sont les phospho-lipases A et B. les glyco-lipases, les sulfo-lipases et les mono-glycérides lipases**. [17]**

I.4.1.3 Le troisième groupe :

Constitué par les phospho-lipases C et D. Les phospho-lipases C sont des enzymes qui hydrolysent spécifiquement la liaison entre le glycérol et le phosphate des phospholipides, libérant un di-glycéride et un phosphate d'alcool.

Tandis que, L'hydrolyse de la liaison ester entre le phosphate et l'alcool par les phospho-lipases D entraîne la libération d'un acide phosphatidique et d'alcool **[24].**

Tableau I.2 : Quelques exemples de sources végétales de lipase et leurs applications**.**

Source de lipase	Applications	Références
Noix de coco	Transformation de l'huile de coco	**25**
Mésocarpe du fruit du palmier	Produits pharmaceutiques, détergents industriels, agroalimentaires et cosmétiques	**26**
Fenugrec	Synthèse de produits pharmaceutiques	**27**
Orme	Synthèse d'émulsifiants ou d'agents huilant pour l'alimentation, les apprêts d'essorage et les textiles, d'agents anti-mousse et antistatiques pour les plastiques et lubrifiants, le traitement de l'eau.	**28**

I.4.2 Lipases de mammifères:

Sont des enzymes hydrosolubles spécialisées dans l'hydrolyse de triglycérides en glycérol et en acides gras. Ce qui est essentiel pour la décomposition des graisses dans l'organisme. Elles interviennent dans la digestion et l'absorption des lipides chez les mammifères y compris les humains **[17].**

Elles sont présentes dans divers tissus et organes tels que l'estomac, le pancréas, la foi, la langue. Elles sont classées en trois principales catégories :

A. Le premier est constitué par les lipases associées à la digestion, telles que les lipases linguale, gastrique et pancréatique.

B. Le second groupe correspond aux lipases présentes dans le cerveau, les muscles, les artères, les reins, la rate, le foie et les tissus adipeux.

C. Le troisième groupe correspond aux lipases produites par les glandes galactogènes produisant le lait maternel **[17]**.

Tableau I.3 : Exemples de lipases issues de mammifères.

Type de lipase	Localisation et fonction	Référence
Lipase Gastrique	– sécrétée par la muqueuse de l'estomac, – décompose les lipides alimentaires.	**[29]**
lipase hépatique	– joue un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines présentes dans le sang. – dégrade les glycérides, les phospholipides et les esters de cholestérol.	**[17]**
Lipase pancréatique	– Secrétées dans le duodénum ; – responsable de la digestion des lipides alimentaires.	**[30]**
Lipase Linguale	– Produite principalement par les glandes linguales. Libérée dans la bouche via la salive. – catalyse la première étape de la digestion des lipides, en particulier des triglycérides**.**	**[31]**
Lipase hormono-snsibles	– Intracellulaire, présente dans les adipocytes, – capable d'hydrolyser les triglycérides et une grande diversité d'esters.	**[32]**

I.4.3 Lipases microbiennes:

Les lipases microbiennes sont produites par les champignons filamenteux, les bactéries, les levures. Les lipases sont produites chez les bactéries à Gram (+) telles que « *les Bacillus* » et Gram (-) telles que les « *Pseudomonas* ». Elles sont produites chez les champignons filamenteux tels que « *Rhizopus* » **[33]**. Elles sont produites lors de la

fermentation comme métabolites primaires, en présence de substrats inducteurs tels que les acides gras **[34].**

Selon leur excrétion exo- ou endo-cellulaire, les lipases sont séparés plus ou moins facilement par différentes méthodes. Les lipases microbiennes présentent une grande stabilité vis-à-vis de température, des détergents et des enzymes protéolytiques **[17].** L'intérêt aux lipases microbiennes n'a cessé de croitre au cours de ces dernières années principalement en raison du grand nombre d'applications qu'elles offrent dans les domaines très variés **[33].**

Tableau I.4 : Certaines espèces microbiennes productrices de lipase.

Espèce	Substrat inducteur	Références
Yarrowialipolytica	Acide oléique	**35**
Saccharomyces Cerevisiae	Galactose	
Candida antartica A	Méthanol	**36**
Bacillus sp	Blé	**37**

I.4.4 Les cutinases:

Les organes aériens des plantes sont protégés par une cuticule composée d'un composé structurel polymère insoluble, la cutine, qui est un polyester composé d'acides gras hydroxy et hydroxyépoxy. Les cutinases sont des enzymes qui catalysent la dégradation des polyesters qui forment la cuticule qui protège les plantes **[38].**

Ces enzymes sont synthétisées par des champignons pathogènes et phytopathogènes tels que « Fusariumsolan », qui est l'agent responsable de la formation de mycétome chez

l'homme, ou tels que Fusarium Oxysporum Radicis-lycopersici qui est responsable de la pourriture de la racine et du collet chez la tomate et certaines céréales **[39].**

I.5 Substrats hydrolysés par la lipase :

Les lipases sont capables d'hydrolyser les triacylglycérols (TAGS) et les diacylglycérols (DAG), mais ne peuvent généralement pas hydrolyser les monoacylglycérols (MAG).

Certaines lipases sont également capables d'hydrolyser les phospholipides, les galacto-lipides, les esters de stérol et les esters synthétiques à chaîne courte (solubles dans l'eau) **[7]**, par conséquent, les lipases sont capables d'agir sur des centaines de substrats différents, et ces activités peuvent avoir une signification physiologique.

I.6 Réactions caractéristiques de la lipase :

Les lipases sont des enzymes qui peuvent participer à de nombreuses réactions. Elles peuvent catalyser diverses réactions allant de l'hydrolyse à l'estérification, en passant par les réactions de trans-esterification et d'inter-esterfication) **[40, 41].**

Cette spécificité de la lipase lui permet de catalyser différentes réactions selon le microenvironnement de l'enzyme, et sa spécificité et ses conditions de réaction douces la rendent intéressante d'un point de vue industriel **[42]**.

I.6.1 Réaction d'hydrolyse :

Les lipases catalysent naturellement l'hydrolyse de la liaison ester des tri-, di-et mono-glycérides en acides gras et en glycérol.

En milieu aqueux, les lipases sont des enzymes qui agissent spécifiquement sur les liaisons esters des lipides à longues chaînes. Elles le font dans des systèmes bi-phasiques, à l'interface entre la phase aqueuse et la phase apolaire. Cette réaction est essentielle pour les lipases, et elle libère des mono-glycérides, des di-glycérides, du glycérol et des acides gras. On utilise cette activité hydrolytique dans de nombreux secteurs industriels, comme l'industrie laitière pour la production d'arômes ou le traitement des effluents **[43].**

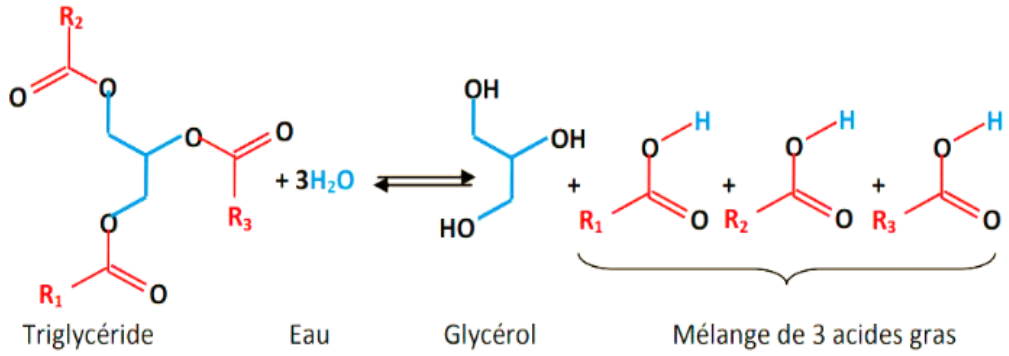


Figure I.7 : Schématisation de la réaction d'hydrolyse de triglycéride **[44].**

I.6.2 Réactions de synthèse :

Les lipases peuvent également catalyser une grande variété de réactions de synthèse dans des conditions thermodynamiques favorables, c'est-à-dire avec une faible activité de l'eau **[45]**.

Il a été bien démontré que les hydrolases telles que les lipases catalysent les réactions inverses de leurs réactions hydrolytiques à l'aide d'un biocatalyseur, c'est les réactions d'éstérification (réaction entre un acide et un alcool), la trans-éstérification (ester et alcool) et l'inter estérification (ester-ester) **[46]** .

I.6.2.1 Réaction d'estérification :

L'estérification est l'une des réactions le plus importante en chimie organique et l'industrie est constamment à la recherche de procédés d'estérification pratiques **[47].**

Cette réaction est l'inverse de l'hydrolyse et consiste à la formation d'un ester à partir d'un acide gras et d'un alcool, avec libération d'eau, elle est réversible et atteint un état d'équilibre et peuvent être catalysés par une lipase en présence d'un solvant non aqueuse.

I.6.2.1.1 Mécanisme d'action : [48]

L'estérification se déroule en deux étapes principales :

1. **Formation d'un ion acylium :** L'acide carboxylique perd un proton (H^+) en présence d'un catalyseur, générant un ion acylium ($R-COO^-$).
2. **Attaque nucléophile par l'alcool :** L'atome d'oxygène nucléophile de l'alcool attaque le carbone carbonyle de l'ion acylium, formant une liaison covalente et éliminant une molécule d'eau.

I.6.2.1.2 Les facteurs influençant l'estérification : [49]

- **Nature des réactifs :** La structure et la taille de l'acide carboxylique et de l'alcool influencent la vitesse et l'équilibre de la réaction.
- **Conditions réactionnelles :** La température, le pH et la présence d'un catalyseur (acide fort ou enzyme comme les lipases) affectent également la réaction.
- **Solvant :** L'utilisation d'un solvant approprié peut favoriser la solubilisation des réactifs et améliorer l'efficacité de la réaction.

I.6.2.1.3 Types d'estérification:

a. Estérification directe :

La réaction d'estérification directe est une réaction simple et réversible entre un acide carboxylique et un alcool pour former un ester. Elle est réalisée en présence d'un acide fort ou d'une base forte comme catalyseur, elle peut être lente et inefficace pour certains réactifs **[50].**

b. Estérification par chlorure d'acide :

Cette méthode implique la conversion de l'acide carboxylique en chlorure d'acide (R-COOCl) plus réactif, puis sa réaction avec l'alcool pour former un ester. La réaction est réalisée en présence d'une base comme catalyseur et la réaction est irréversible [51].

c. Estérification par anhydride carboxylique :

Il s'agit d'une réaction entre un anhydride carboxylique (R-CO-O-CO-R'), (ce qui est un réactif plus puissant que l'acide carboxylique et permet d'une estérification plus rapide). Et un alcool pour former un ester. La réaction est réalisée en présence d'une base comme catalyseur et elle est irréversible **[52, 53].**

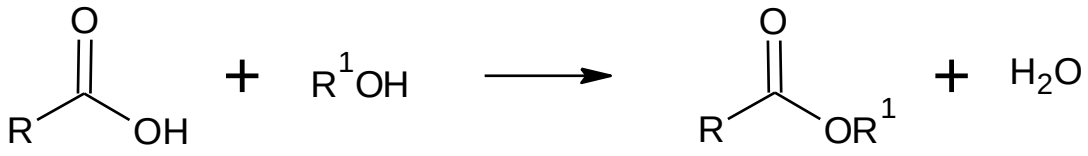


Figure I.8 : Réaction d'estérification directe entre un acide et un alcool **[54].**

I.6.2.2 Réaction de trans-éstérification:

Cette réaction implique le transfert du groupe acyle d'un ester à un autre alcool. Elle est particulièrement utile pour la synthèse d'esters ayant des structures spécifiques.

La trans-éstérification regroupe :

a. la réaction d'alcoolyse :

Il s'agit de la réaction d'un ester avec un alcool mono-hydrique, tel que l'éthanol ou le butanol, ou un alcool poly-hydrique, tel que la glycérine, pour produire des esters avec différents groupes alkyle **[42].**

Par échange du groupement alcool :

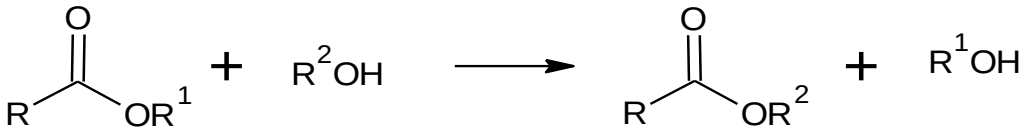


Figure I.9 : Schématisation de réaction d alcoolyse **[54].**

b. la réaction d'acidolyse :

Il s'agit d'une réaction entre un ester et un acide qui entraîne une modification du groupe acyle (le groupe acyle est converti en acide gras) **[55]**.

Par échange du groupement acyle **:**

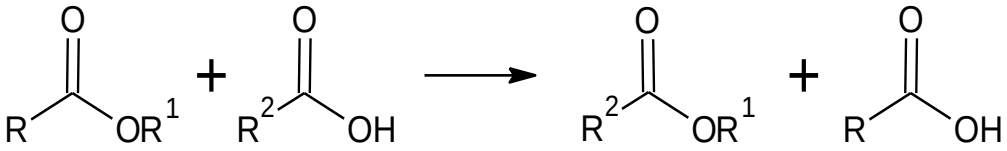


Figure I.10 : Schéma représentative de réaction d'acidolyse **[54].**

c. Réaction d'inter-estérification :

Dans ce cas, les lipases jouent un rôle clé en catalysant la séquence de coupure et de synthèse des liaisons esters. Bien que le terme "estérification" fasse référence à la réaction entre un acide et un alcool, les lipases ont en réalité une grande diversité de

substrats et peuvent transférer un groupe acyle sur d'autres atomes tels que le soufre et l'azote, formant ainsi des liaisons Thio esters et amides **[56]**.

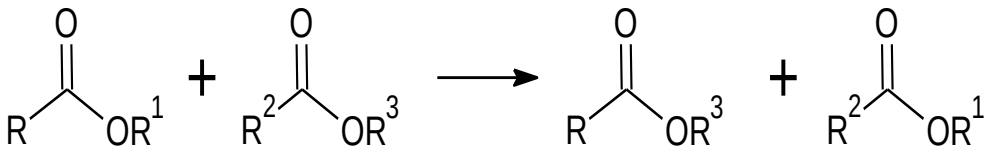


Figure I.11 : Schéma de réaction d'inter-estérification **[54]**

I.6.2.2.1 Mécanisme d'action : [57]

Elle se déroule en deux étapes principales :

1. Attaque nucléophile par l'alcool : L'atome d'oxygène nucléophile de l'alcool attaque le carbone carbonyle de l'ester, formant une liaison covalente et éliminant un alcool (R2OH).

2. Formation d'un nouvel ester : L'anion alkoxyde formé attaque ensuite le carbone carbonyle d'un autre ester, formant un nouvel ester (R1COOR3) et régénérant l'alcool initial (R3OH).

I.6.2.2.2 La nature du milieu de trans-estérification : [36]

a. **Milieu homogène** : Les réactifs et le catalyseur sont tous présents dans la même phase (généralement en solution).
b. **Milieu hétérogène** : Les réactifs et le catalyseur sont présents dans des phases distinctes (par exemple, un catalyseur solide et des réactifs liquides), on a deux types de catalyseur tels que le catalyseur hétérogène basique et le catalyseur enzymatique (lipase)**.**

Tableau I.5 : Comparaison entre le catalyseur homogène et le catalyseur hétérogène **[58].**

Catalyseur Homogène	Catalyseur Hétérogène
- Catalyseur souvent plus actif et plus sélectif difficultés de séparation et recyclage. - Thermique plus favorable. De solvant et du catalyseur, - Réaction plus simple et échanges.	- Catalyseur plus stable mais moins actif et moins sélectifs. - Chaleur de réaction récupérable à un niveau thermique plus élevé. - Réacteurs plus complexes avec problème important d'échange thermique

I.6.2.2.3 Les facteurs qui influencent la trans-ésterification : [59, 60].

- **Nature des réactifs** : La structure et la taille des esters et des alcools influencent la vitesse et l'équilibre de la réaction.
- **Conditions réactionnelles** : La température, le pH et la présence d'un catalyseur (acide fort ou enzyme comme les lipases) affectent également la réaction.
- **Solvant** : L'utilisation d'un solvant approprié peut favoriser la solubilisation des réactifs et améliorer l'efficacité de la réaction.

Voici quelques exemples de synthèse enzymatique réalisés par la lipase :

Tableau I.6 : Réactions enzymatiques réalisées par la lipase **[61].**

Réactions	Source d'enzyme	Substrat	Application
Hydrolyse	*Thermomyces Lanuginosus*	Huile d'olive	Cosmétiques, lubrifiants
Estérification	*Candida atarctica*	Acide lactique	Agro -alimentaire, pharmaceutique
Trans estérification	*Chromobacterium Viscosum*	Huile de jatropha	Carburéacteur, biodiesel
Alcoolyse	*Candida atarctica*	Acyl ribonucléosides	Produits pharmaceutique
Acidolyse	*Candida atarctica*	Huile de bourrache, acyle glycérol	Détergents, industrie alimentaire, médicaments

I.7 Les caractéristiques des lipases:

Les lipases (acyle-glycérol hydrolases EC 3 .1 .1.3) sont largement présentes dans la nature, les animaux, les plantes, les champignons ou les bactéries.

La fonction première des lipases est l'hydrolyse des triacylglycérols. Cette réaction mène à la libération de glycérol et d'acides gras. Toutefois, en fonction de la quantité d'eau présente dans le milieu, les lipases peuvent également être responsables de réactions de synthèse.

Cette particularité des lipases de catalyser diverses réactions en fonction du leurs spécificités et leurs conditions douces de réactions, les rendent intéressantes du point de vue industriel. Les propriétés de fonctionnement de la lipase peuvent varier en fonction de son origine et de son utilisation spécifique **[18]** .Voici quelques-unes des propriétés de la lipase :

a. Température :

La lipase à une plage de température optimale à laquelle elle est la plus active. En général, les lipases fonctionnent mieux à des températures modérées, généralement entre 25 °C et 40 °C.

Cependant, certaines lipases peuvent devenir actives à des températures élevées, telle que la lipase de « *Pseudomonas fragi* » à une température de 75 °C, tandis que d'autres peuvent être plus stable à des températures plus basses, c'est le cas « *d'Aspergillus Niger* » qui une température optimale de 25 °C **[62].**

b. Valeur de pH :

Le pH dépend également de son origine. La plupart des lipases fonctionnent dans une plage de pH neutre à légèrement acide. Généralement comprise entre 6 et 8. Cependant, certaines lipases sont actives dans des environnements plus alcalins ou plus acides. Comme la lipase de « *Yarrowia lipolytica* » qui présente un pH optimum de 6 **[63].**

c. Substrat:

La lipase est spécifique de certains substrats lipidiques tels que les triglycérides. Catalyse la dégradation des lipides en acides gras et glycérol. Certains types de lipases agissent sur d'autres substrats comme les phospholipides, comme la lipase « *A2 pancréatique* » **[62].**

d. Activité:

La lipase est une enzyme hautement active et efficace dans la dégradation des lipides. Leur capacité à catalyser rapidement des réactions en fait des enzymes précieuses pour de nombreuses applications industrielles, notamment la production alimentaire, pharmaceutique et de biocarburants **[63].**

I.7.1 Les caractéristiques de lipase ricin :

Nous intéressons à la lipase issue de graines de « *Ricinus communis* » à cause de leur caractéristique : Récemment, les lipases des graines de « *Ricinus communis* » ont fait l'objet d'une grande attention en tant que biocatalyseurs. Dans certains cas, ces enzymes présentent des avantages par rapport aux lipases animales et microbiennes dues à quelques fonctionnalités assez intéressantes telles que spécificité, faible coût, disponibilité et facilité de purification, ce qui représente des excellentes enzymes industrielles **[64].**

a. pH :

La graine de ricin contient deux lipases. L'un est présent dans les graines au repos et à un pH acide optimal (1-3), l'autre apparaît après plusieurs jours de germination et présente un pH optimal proche du neutre (4) **[64].**

b. Température :

La lipase de ricin est un enzyme qui catalyse les réactions d'hydrolyse, d'estérification et de trans-estérification à des températures inférieures à 60 °C. L'enzyme est assez stable à 60 °C**.** Et à 45 °C, elle est stable pendant des périodes beaucoup plus longues **[64].**

c. Substrats :

La lipase de ricin a montré une préférence pour les triglycérides de longueur de chaîne C_8. Aucune expérience n'a été menée sur les triglycérides saturés dont la longueur de chaîne est supérieure à C_{12}, car un problème de solubilité s'est alors posé.

Les triglycérides d'acides gras insaturés en C_{18} : huile de coton, trilino- leine, trioléine et triricinoléine, ont été hydrolysés environ 40 à 50 %, plus lentement que le triglycéride saturé en C_8. **[64].**

- **Les effecteurs de la lipase de ricin :**

Les inhibiteurs : Ce sont molécules ou ions qui tendent à empêcher l'accès des substrats aux sites catalytiques, ce qui diminue le nombre (site actif) d'enzymes impliquées dans le processus de catalyse**.**

Les activateurs : S'associent à l'enzyme ou au complexe ES, qui ont pour effet d'augmenter la vitesse des réactions enzymatiques sans être eux-mêmes impliquées dans la réaction catalysée par l'enzyme **[65]. Le tableau I.7** suivant présente quelques exemples des effecteurs de lipase de « *Ricinus communis* ».

Tableau I.7 : Quelques effecteurs de lipase de **«** *Ricinus communis* » **[64, 65].**

Les activateurs	Les inhibiteurs
Ca^{2+}	réactifs mercuriels
Mg^{2+}	Cu^{2+}
K^{+}	Na^{2+}

I.8 Les applications de la lipase :

Les lipases sont un groupe important d'enzymes, représentent moins de 10 % du marché mondial des enzymes industrielles et caractérisé par leur capacité à hydrolyser les triglycérides en acides gras libres et en alcools. Elles sont utilisées dans de nombreux segments industriels, parmi lesquelles nous citons :

I.8.1 Applications alimentaires :

Les lipases sont des enzymes qui jouent un rôle important dans l'industrie alimentaire**.** Ils permettent de moduler les aromes, les textures et les propriétés fonctionnelles des aliments dans de nombreuses applications dans cette industrie. De plus les lipases offrent des alternatives plus écologiques, leur utilisation permet de produire des huiles végétales, ce qui est plus écologique que la production d'huiles à partir de sources animales **[66].**

I.8.1.1 Boulangerie :

La lipase joue un rôle crucial dans l'industrie du pain en améliorant sa qualité de différentes manières. Elle augmente le volume du pain en décomposant les lipides, améliore sa structure pour le rendre délicat et doux, et prolonge sa durée de conservation en agissant comme un émulsifiant. De plus, la lipase peut contribuer à l'éclaircissement du pain en décomposant les graisses pour obtenir un effet de blanchiment secondaire **[67].**

I.8.1.2 Pâtisserie :

Les lipases renforcent le gluten, améliorent la texture de la mie, et sont bénéfiques pour les propriétés de manipulation de la pâte **[68]**.

I.8.1.3 Fromagerie :

Elles contribuent à l'amélioration de la saveur du fromage, du temps de maturation, et à la lipolyse de la matière grasse et de la crème du lait **[69]**.

I.8.1.4 Industrie laitière :

Le lait contient de la lipase naturelle sécrétée par le sein, qui hydrolyse les globules gras du lait en acides gras libres et en alcools, conduisant à une lipolyse spontanée**.** De plus, des lipases microbiennes peuvent être trouvées en quantité élevée dans le lait. Les lipases ne sont souvent pas préférées pour l'amélioration de la qualité du lait ou des produits laitiers, mais leur utilisation courante est dans la production de fromage en raison de leur influence sur le processus de maturation rapide et le développement de l'arôme, comme le confirment certaines recherches. Il convient également de souligner que le lait maternel contient des lipases qui facilitent la digestion des graisses contenues dans le lait **[69].**

I.8.2 Applications non-alimentaires :

Les lipases sont largement utilisées dans la transformation des graisses et des huiles, détergents et de formulations dégraissage, et dans la synthèse organique, et dans divers produits pharmaceutiques.

I.8.2.1 Détergents :

Les détergents utilisent les lipases afin de supprimer les taches huileuses et grasses des vêtements **[70]**. Ces substances sont choisies afin de satisfaire à des critères particuliers, comme une activité à basse température, une stabilité à haute température, une activité dans des conditions alcalines (pH de 8 ou plus), une stabilité en présence d'autres additifs, une douceur sur la peau et une efficacité sur différents tissus **[69]**.

Les bactéries et les champignons sont les principales sources de lipases utilisées dans les détergents, ce qui permet de diminuer l'utilisation de phosphates dans les formulations de détergents **[71].** La lipase est un élément ajouté aux détergents qui permet aux tensioactifs de se fixer sur les déchets de la tâche afin de les éliminer des vêtements **[72].**

I.8.2.2 Synthèse organique :

Les lipases sont utilisées en synthèse organique pour catalyser diverses réactions, telles que l'estérification, l'acidolysis et l'alcoolysis, avec une forte enantio-, régio- et chimio sélectivité **[73].** En synthèse organique, les lipases peuvent être utilisées pour :

- Produire des arômes spécifiques en catalysant des réactions de Trans-estérification ou d'estérification directe **[2].**
- Synthétiser des composés optiquement actifs en utilisant une approche chimio-enzymatique **[74].**
- Catalyser des réactions en milieu organique, ce qui les rend particulièrement intéressantes pour l'industrie chimique**.**

Les lipases sont d'origine microbienne, végétale ou animale, ce qui augmente encore leurs potentialités en tant qu'outils pour la synthèse organique **[2].**

I.8.3 Applications pharmaceutiques :

Les lipases sont utilisées comme :

- catalyseurs dans la synthèse de certains médicaments, notamment pour la production de composés chiraux qui nécessitent des processus de résolution enzymatique plus efficaces et respectueux de l'environnement.
- Modification des huiles et graisses : Les lipases permettent de modifier physiquement, chimiquement ou par voie enzymatique, des huiles végétales comme l'huile de palme ou d'amande douce, afin d'en élargir les applications commerciales et de répondre à la demande des consommateurs pour des produits plus sains.
- Développement d'arômes : dans l'industrie pharmaceutique, les lipases exogènes (d'origine microbienne) peuvent être utilisées pour accélérer le développement d'arômes lors de la maturation de certains médicaments **[75].**

Dans le tableau suivant, sont regroupés quelques exemples d'applications industrielles de la lipase.

Tableau I.7 : Exemples d'applications industrielles des lipases **[76]**.

Domaine d'application	**Action principale**	**Utilisation**
Alimentation :		
Laiterie et Boulangerie.	Hydrolyse des lipides.	- Modification de la saveur et conservation.
Boucherie	Hydrolyse des lipides.	- Développement de la saveur et

		l'élimination de l'excès de graisse
Huilerie.	Inter-estérification des huiles naturelles.	- Formulation des huiles, margarines et beurres
Chimie fine :		
Corps gras.	Hydrolyse.	- Production d'acides gras, mono et di glycérides.
Détergents.	Hydrolyse des lipides.	- Dosage des glycérides et analyse de la distribution des acides gras.
Cosmétique.	Hydrolyse des lipides	- Elimination de graisses et formulation.
Chimie analytique.	Estérification	- Production d'esters et résolution de mélanges racémiques.
Médical :		
Médecine et Pharmacie	Hydrolyse des lipides	-Traitement d'insuffisance Pancréatique (malabsorption des graisses). -Analyse des triglycérides plasmatiques.

I.9 Immobilisation des enzymes :

L'immobilisation des enzymes est une technique qui consiste à fixer un enzyme sur un support solide (c'est-à-dire liée par des moyens physico-chimiques en surface ou à l'intérieur d'un solide). L'enzyme immobiliser peuvent catalysent l'hydrolyse des esters glycérique en milieu aqueux et la synthèse d'ester en milieu non aqueux **[77].**

1. Les techniques d'immobilisation :

Cette technique peut être obtenue par différentes techniques telle que l'adsorption, la réticulation, le pontage covalent, le piégeage physique dans des gels, la micro encapsulation, et la liaison covalente entre un porteur et des groupes fonctionnels de l'enzyme **[78]**.

2. Le choix de la technique d'immobilisation :

Dépend des caractéristiques de l'enzyme et du support ainsi que de l'application souhaitée. L'immobilisation permet :

- de modifier une surface.
- de diminuer la perte d'enzyme,
- de faciliter la récupération et la réutilisation et stabiliser enzyme **[79].**

Cependant, l'immobilisation peut affecter l'activité et la stabilité de l'enzyme. Par exemple la stabilité thermique de l'enzyme immobilisée peut augmenter, mais son activité peut diminuer en fonction de la technique d'immobilisation utilisée **[80]**.

Lors de l'immobilisation, l'enzyme est fixée à un support : les propriétés du support influencent également l'efficacité d'immobilisation et l'activité catalytique de l'enzyme, qui rend encore plus important de trouver un procédé d'immobilisation approprié **[81].**

Ils peuvent être classés en deux grands groupes :

- **les supports organiques :** peuvent être activés chimiquement par différentes technique ce qui constitue l'un de leur principaux avantage, car ils permettent la fixation des enzymes par diffèrent voies. Et qu'ils comprennent les polyosides (acétate de cellulose, nitrate de cellulose, dextrine, alginate, amidon), les polymères (le polyéthylène, le polypropylène, le polystyrène…etc.)
- **les supports inorganiques :** sont généralement plus stable (résistants à l'abrasion aux agents chimique et aux bactéries, mais l'immobilisation covalente sur ces support est difficile en raison de leur faible réactivité tel que (verre poreux, silice, métallique, aluminosilicates, etc.…) **[82].**

CHAPITRE II :

Exemple d'application

De la catalyse enzymatique

Par la lipase :

Synthèse de sucroesters.

II. EXEMPLE D'APPLICATION DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE PAR LA LIPASE : SYNTHESE DE SUCROESTERS :

II.1 Introduction:

La lipase issue de grains de ricin « *Ricinus communis* » présentent un pouvoir catalytique important et une stabilité d'activité lipasique par rapport à d'autres sources végétales. Avec une grande capacité de catalyser des réactions d'hydrolyse et de synthèse. En raison de ces propriétés cette enzyme est devient vraiment captivants **[83].**

Ces dernières années, les applications des lipases sont nombreuses et touchent plusieurs secteurs, telle que le domaine alimentaire, cosmétique et le pharmaceutique et aussi dans le domaine de la synthèse, s'est considérablement développée.

parmi les synthèses enzymatiques prometteuses c'est la production d'esters de sucres et d'acides gras, qui sont des composés formés par estérification d'un ou plusieurs groupes fonctionnels hydroxyles de sucres avec des acides gras ou des dérivés d'acides gras (tels que les esters méthyliques d'acides gras). Ils présentent donc à la fois une partie hydrophile due au sucre et une partie hydrophobe due à la chaîne carbonée de l'acide gras. Ce sont des molécules aux propriétés tensioactives qui peuvent être classées sous la nomenclature des tensioactifs non ioniques **[61].**

II.2 Définition de sucroester :

Le terme « sucroesters » regroupe l'ensemble des produits obtenus par une réaction d'estérification ou de Trans-estérification entre un acide gras et un sucre en milieu organique **[84]**. Un sucroester peut être synthétisé par des procédés chimique et enzymatique en présence de lipase [**85].**

Les sucroesters sont considérés comme des tensioactifs non ioniques, (c'est-à-dire ils sont totalement ou partiellement solubles dans l'eau en raison de la présence de groupes fonctionnels ayant une forte affinité pour l'eau **[86].** Les sucroesters couvrent une large gamme de composés ayant différentes valeurs de balance hydrophile – lipophile (HLB). Ils sont également distingués en raison de leur haute biodégradabilité et la faible toxicité et leur grande tolérance oculaire et cutanée **[87**]. Ils ont été agrées par l'administration des aliments et des médicaments**.** (FDA) en 1983 **[88]**. La réaction générale de la synthèse des esters de sucre est représentée sur **La figure II.1 :**

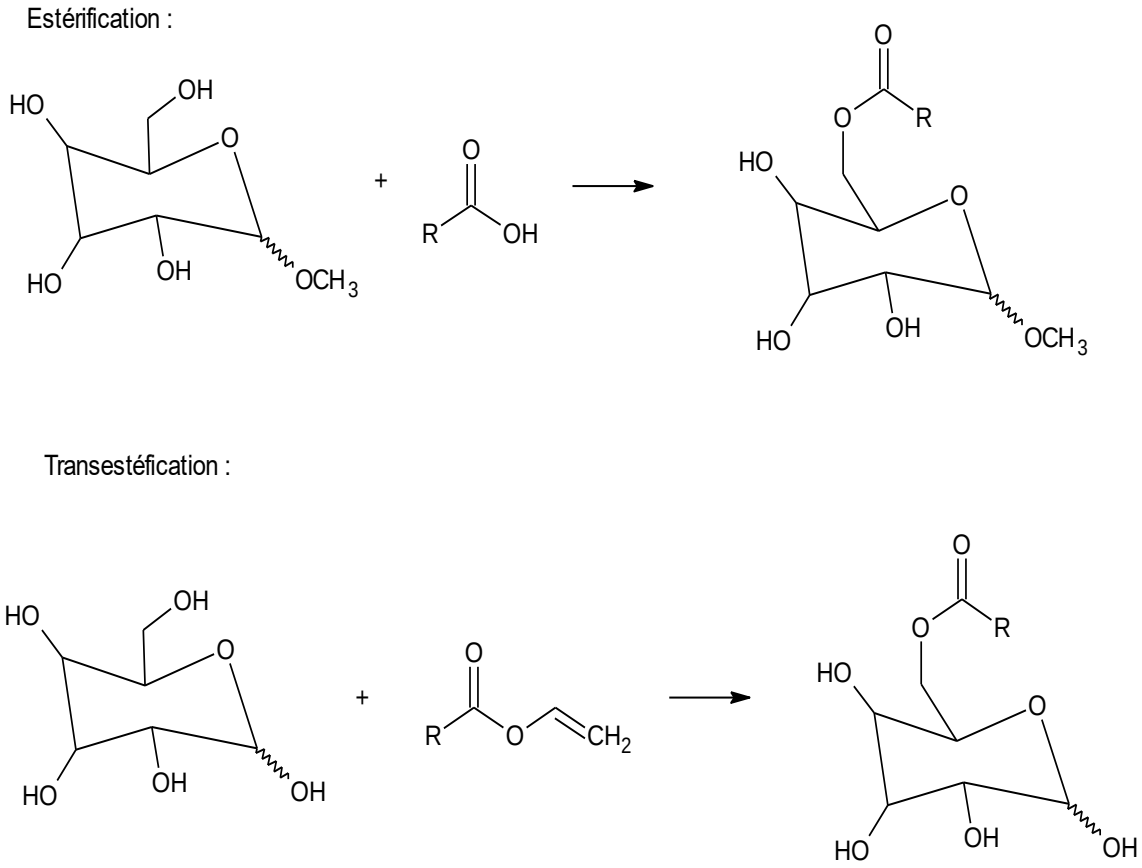


Figure II.1 : Synthèse de sucroesters par : estérification du méthyl glucoside avec des acides gras ou Trans estérification du glucose avec des esters vinyliques d'acides gras [**89**].

II.3 Structure des sucroesters :

Les esters de sucre sont des composés amphiphiles (c'est-à-dire qu'ils sont composés d'une partie polaire (cationique, anionique,) et d'une autre partie apolaire (chaîne aliphatique ou aromatique). et de structure simple **[90, 91]**. Ils sont obtenus par greffage les chaines d'acides gras (la partie hydrophobe) sur le sucre (la partie hydrophile), par une liaison ester. Les premiers esters de sucres commercialisés sont les esters de saccharose **(Figure II.2)** Tout d'abord autorisé en 1959 au Japon **[88]**.

Le saccharose est un disaccharide formé par la condensation du glucose et du fructose, il possède 8 groupes hydroxyle et peut réagir avec les esters d'acides gras pour former des esters de saccharose. Parmi les 8 groupes hydroxyle du saccharose, trois (C_6, C_1' et C_6') sont des groupes hydroxyle primaires, tandis que les autres groupes hydroxyle (C_2,C_3, C_4, C_3' et C_4') sont des groupes hydroxyle secondaires. (Les nombres 1 à 6 représentent la position du carbone sur le glucose, tandis que les nombres 1' à 6' représentent la position du carbone sur le fructose. Les trois groupes hydroxyles primaires sont plus réactifs en raison de leur plus faible

encombrement stérique, ils réagir d'abord avec l'acide gras, produire des mono-esters, des di-esters ou des tri-esters de saccharose **[92, 93].**

La structure générale des ester de saccharose est représentée sur **La figure II.2 :**

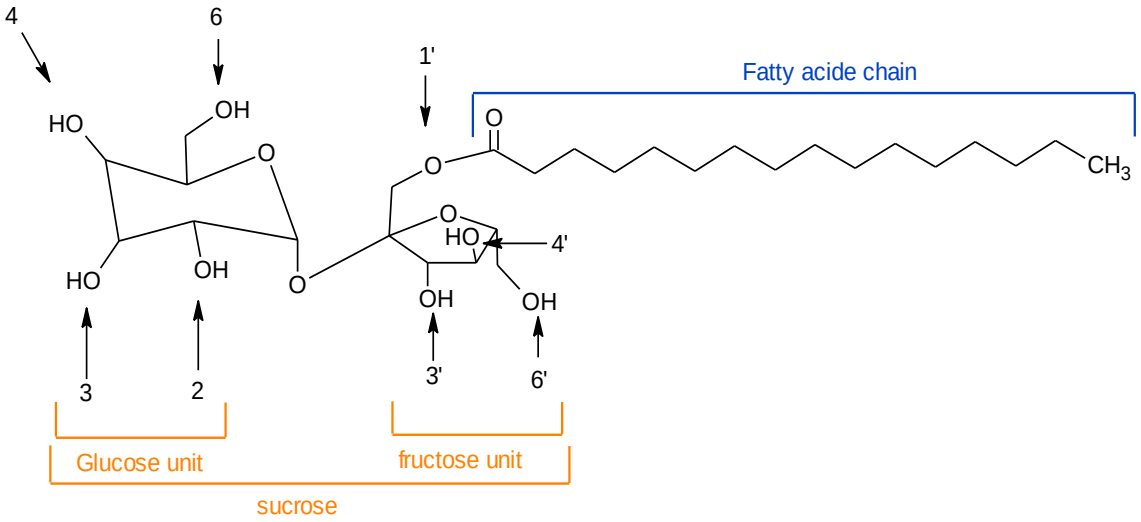


Figure II.2 : Structure chimique des esters de saccharose **[86].**

II.4 Les types des sucroesters :

Les esters de sucre sont classés en fonction du nombre et du type d'acide gras utilisés et du nombre de groupes hydroxyle du saccharose estérifiés **[94]**.

II.4.1 Classification selon le type d'acide gras :

Les acides gras sont des composés organiques de structure générale R-COOH, constitués uniquement de carbone (C), d'hydrogène (H) et d'oxygène (O) **[95].**

On peut donc classer les acides gras en deux groupes :

- **Les acides gras saturés** : ils sont constitués d'une chaine hydrocarbonée ne renfermant pas des doubles liaisons, Ils sont solides et assez stables à température ambiantes. Les plus rencontrés sont l'acide palmitique (C_{16} : 0) et l'acide stéarique (C_{18}: 0) **[96]**.

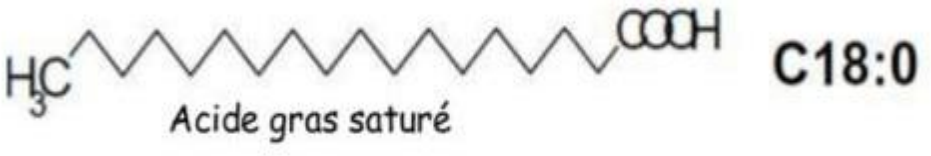


Figure II.3 : Représentation de structure d'un acide gras saturé **[97].**

- **Les acides gras insaturés** : ils sont fluides à température ambiante et sont classés en deux catégories :

→ **Les acides gras mono-insaturés :** On parle d'acide gras mono-insaturé lorsqu'il n'y a qu'une seule double liaison. Les acides gras mono-insaturés ont la formule chimique suivante :

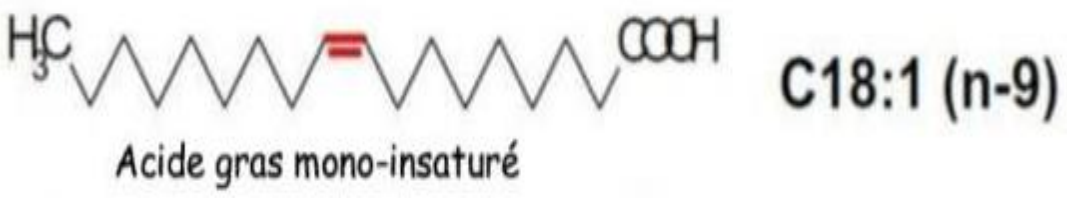


Figure II.4 : Structure d'un acide gras insaturé **[97].**

→ **Les acides gras polyinsaturés** : ce sont des acides qui contiennent plusieurs instaurations. Il existe deux familles d'acides gras polyinsaturés essentiels nommés n-3 (famille des 3) et n-6 (famille des 06) par rapport à la position des dernières doubles liaisons **[107].**

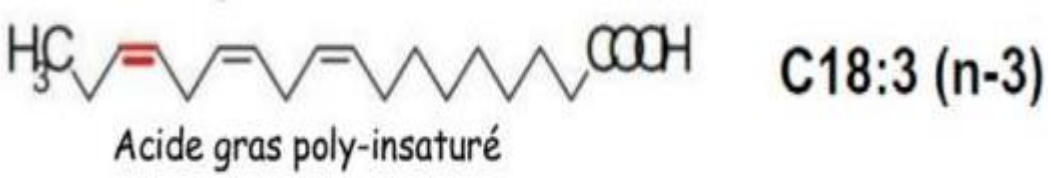


Figure II.5 : Structure d'un acide gras poly insaturé **[97].**

Il existe environ cent cinquante (150) acides gras naturels, qui se distinguent par la nature de la chaîne carbonée et sa longueur. Concernant la synthèse des esters de saccharose,

on s'intéresse particulièrement à l'acide laurique, l'acide palmitique, l'acide oléique, l'acide stéarique et à l'acide caprylique **[84].**

Les acides gras utilisés dans la production de sucroesters sont principalement dérivés de sources naturelles, tels que les huiles végétales et les graisses animales. Le choix des acides gras dépend des propriétés souhaitées pour l'ester final. Par exemple, les acides gras saturés comme l'acide stéarique confèrent une texture plus ferme, tandis que les acides gras insaturés comme l'acide oléique apportent plus de fluidité.

Ces acides gras utilises dans la synthèse de sucroesters peut affecter leur propriétés telles que leur balance hydrophile-lipophile, qui détermine leur adéquation à différentes applications comme illustré sur **Le tableau II.1 [98, 99].**

Tableau II.1 : Types des sucroesters et leurs utilisations **[100].**

L'acide gras	Sucroester	Utilisations
Acide oléique	Oléate de saccharose	émulsifiants et texturants dans les produits de soins personnels.
Acide laurique	Laurate de saccharose	émulsifiants et texturants dans les produits de soins personnels.
Acide stéarique	stéarate de saccharose	émulsifiants et agent de libération dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques
Acide caprylique	Caprylate de saccharose	émulsifiants et texturants dans les produits de soins capillaires et les aliments.
Acide palmitique	Palmitate de saccharose	émulsifiants et agents de texture dans les produits cosmétiques et alimentaires

II.4.2 Classification en fonction de nombre de groupes hydroxyle du saccharose estérifiés :

La réaction entre le saccharose (qui contient 8 groupes hydroxyles) et les acides gras conduit à la formation des sucroesters par estérification enzymatique, généralement une lipase, qui catalyse l'addition d'un groupe acide gras à un hydroxyle du saccharose. Les sucroesters obtenus peuvent avoir un nombre variable de groupes hydroxyle estérifiés, ce qu'influence leurs propriétés physico-chimiques plus le nombre de groupes hydroxyle estérifiés est élevé, plus les sucroesters sont hydrophiles, ce qui les rend plus efficaces comme agents tensioactives. La synthèse enzymatique des sucroesters cible spécifiquement les groupes hydroxyles du saccharose. Les lipases, qui sont les enzymes les plus couramment utilisées pour cette réaction, permettent une s'acylation sélective d'un ou plusieurs groupes hydroxyle de la molécule de saccharose **[91].**

- **Sucroesters monoesters :** contiennent un seul groupe hydroxyle estérifié.
- **Sucroesters diesters :** comportent deux groupes hydroxyle estérifiés.
- **Sucroesters triesters :** contiennent trois groupes hydroxyle estérifiés.
- **Sucroesters polyesters :** comportent plus de trois groupes hydroxyles estérifiés **[94].**

II.5 Les caractéristiques générales de sucroesters :

Les esters de sucre fabriqués à partir de matières premières renouvelables abordables comme les acides gras et les sucres, par réaction d'estérification entre un sucre et un acide gras ou par réaction de Trans-estérification d'un sucre avec des esters éthyliques. Ils sont vraiment captivants en tant que tensioactifs non ioniques **[101, 102]**. En contrôlant différents paramètres telles que le degré d'estérification et la nature de l'acide gras et du sucre, on peut produire une large gamme d'esters de sucres aux caractéristiques fonctionnelles spécifiques pour diverses applications. Les esters de saccharose, par exemple, se distinguent par leur haute valeur de HLB, leurs excellentes propriétés physiques et leur efficacité comme émulsifiants **[103]**.

II.5.1 Propriétés physiques :

II.5.1.1 Balance hydrophile- lipophile (HLB) :

En 1949, Griffin a introduit le concept de balance hydrophile – lipophile (HLB), une grandeur caractérisant la solubilité préférentielle des tensioactifs dans l'eau ou dans l'huile.

Les produits non ioniques que nous considérons ici (les sucroesters) vont des substances très lipophiles jusqu'à des produits hydrosolubles très hydrophiles. Ils se classent selon l'importance relative des parties hydrophiles et lipophiles **[104]**.

Le fragment polaire saccharose sert d'extrémité hydrophile de la molécule, tandis que la longue chaine d'acide gras sert d'extrémité lipophile de la molécule. Les esters de sucre ont une valeur de HLB de 3 à 16. Ils contiennent donc deux parties : La partie lipophile (la longue chaine d'acide gras) ayant une faible valeur de HLB comprise entre 3,5 et 6, et la partie hydrophile (le fragment polaire de saccharose) ayant une valeur de HLB élevée entre 10 et 16**.**

La HLB des tensioactifs non ioniques (sucroesters) dépend du type de sucre ainsi que du type et du nombre de chaines grasses, peut également être calculée par la méthode suivante **[105] :**

$$\mathbf{HLB} = \left(1 - \frac{Is}{Ia}\right) * 20$$

Avec :

Is : indice de saponification de l'ester,

Ia : indice d'acide de l'acide gras.

En raison de ce caractère, les sucroesters ont différentes propriétés selon la valeur HLB **[106]**.

- **Faible HLB** : de 3 à 6, bon émulsifiant E/H.
- **Moyen HLB** : de 7 à 9, bon agent mouillant.
- **HLB élevé** : de 10 à 16, bon émulsifiant H/E**.**

Les applications de sucroesters et leur valeur de HLB sont regroupées dans **Le tableau II.2** :

Tableau II.2 : Valeurs de HLB de quelques sucroesters et propriétés **[91].**

Sucroester	Valeur de HLB	Propriétés
Trioléate de sorbitan	1.8	Anti moussant
Laurate de saccharose	12.4	Emulsifiant (H/E)
Caprylate de saccharose	13.8	Détergent
Laurate de glucose	8.8	Moussant

II.5.1.2 Emulsification :

Les sucroesters jouent le rôle d'un émulsifiant, en stabilisant les émulsions (la dispersion d'un liquide sous forme de globules dans un autre liquide non miscible) **[107],** qui ont tendance à se séparer naturellement. Grâce à leur structure moléculaire unique. Ils ont une partie hydrophile (qui aime l'eau) formée à partir de la partie saccharose et une partie lipophile (qui aime l'huile) formée à partir d'acides gras.

Ils ont la particularité d'être amphiphiles. Cette structure leur permet d'être positionnés à l'interface huile-eau des gouttelettes d'émulsion en fonction de leur affinité pour chaque phase. En se positionnant à l'interface, l'énergie libre interfaciale est réduite, Cela crée une barrière physique qui empêche les gouttelettes d'huile de s'agglutiner et de se séparer de la phase aqueuse **[108].** Ce qui contribue à stabiliser l'émulsion. C'est-à-dire qu'ils ont la capacité de lier simultanément l'eau et l'huile **[109].** Cela montre dans **La figure II.6** suivante :

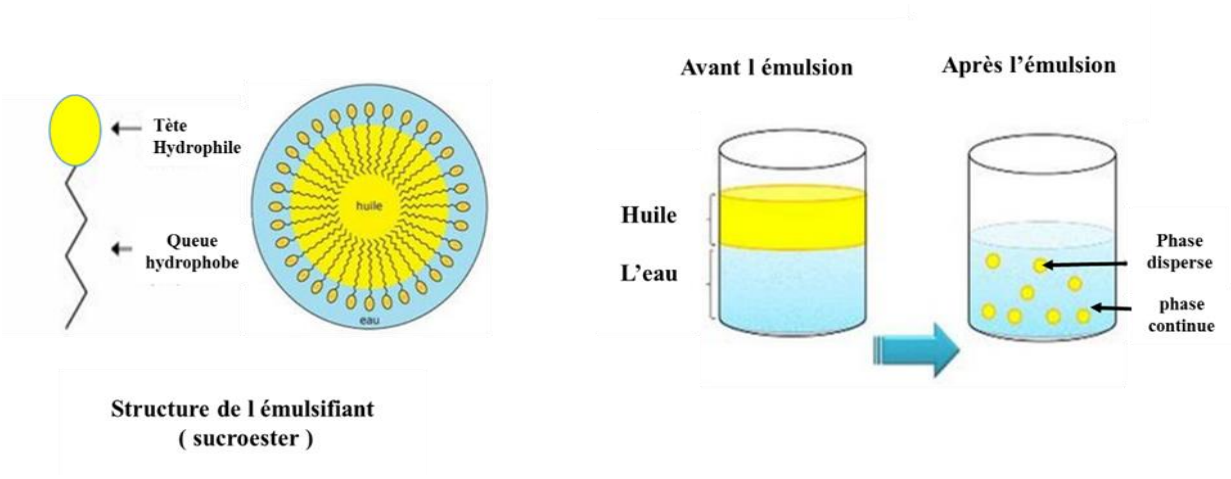


Figure II.6 : Représentation d'une émulsion en présence d'un émulsifiant (sucroester) **[97].**

Les émulsions peuvent également être Huile/ eau, si la phase continue est constitué d'un liquide polaire associé (d'ordinaire, il s'agit d'eau ou d'une solution aqueuse) et les émulsions eau / huile si la phase continue est une phase grasse **[110]. (Figure II.7)** représente les types d'émulsion :

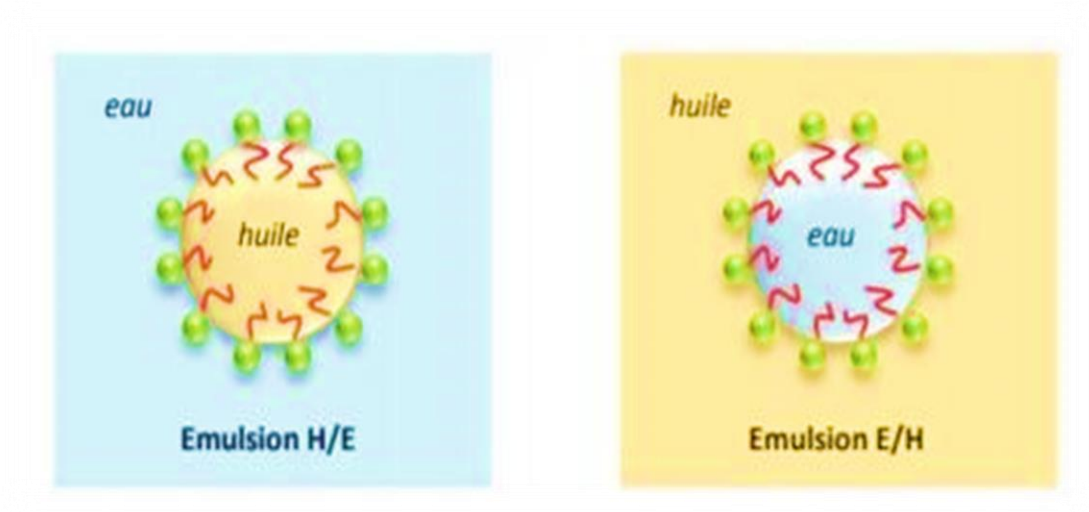


Figure II.7 : Schéma des émulsions : huile dans eau et eau dans huile **[111].**

Dans le tableau suivant quelques exemples de sucroesters agissant comme émulsifiant dans 2 types d'émulsions.

Tableau II.3 : Exemples des sucroesters utilisées comme émulsifiants **[112].**

Emulsion	Sucroester	Phase dispersée	Phase dispersante	Symboles	Exemples
Emulsion huile dans eau (H/E)	Mono –ou di-esters de saccharose	Lipophile (H)	Hydrophile (L)	L/H, H/E	Produits lactés
Emulsion eau dans huile (E/H)	Polyesters de saccharose	Hydrophile (L)	Lipophile (H)	H/L, E/H	Margarine

II.5.1.3 Le comportement de sucroesters dans différents pH :

Le pH de la solution peut influencer la solubilité et l'activité des sucroesters. Dans un environnement acide, ils ont tendance à être plus hydrophobes et plus efficaces pour stabiliser les émulsions huileuses dans l'eau. En revanche, dans un environnement alcalin, les sucroesters ont tendance à être plus hydrophiles **[113].**

II.5.1.4 Les sucroesters comme agent de moussant :

Les mousses étant des systèmes dispersés, comme les émulsions (dispersion de gaz dans une phase continue fluide). Pour former une mousse, il faut tout d'abord mélanger intimement

un gaz et un liquide. Durant les premiers instants de la vie de la mousse, la présence de substances capables de stabiliser le film est essentiel pour permettre l'accumulation de bulles pour former une dispersion gaz-liquide.

La partie hydrophile de sucroester se lie à la surface de la bulle d'air, tandis que la partie hydrophobe se lié à l'huile ou à l'eau environnante. Cette liaison stabilise les bulles d'air, empêchant leur coalescence et maintenant la mousse stable **(Figure II.8) [114].**

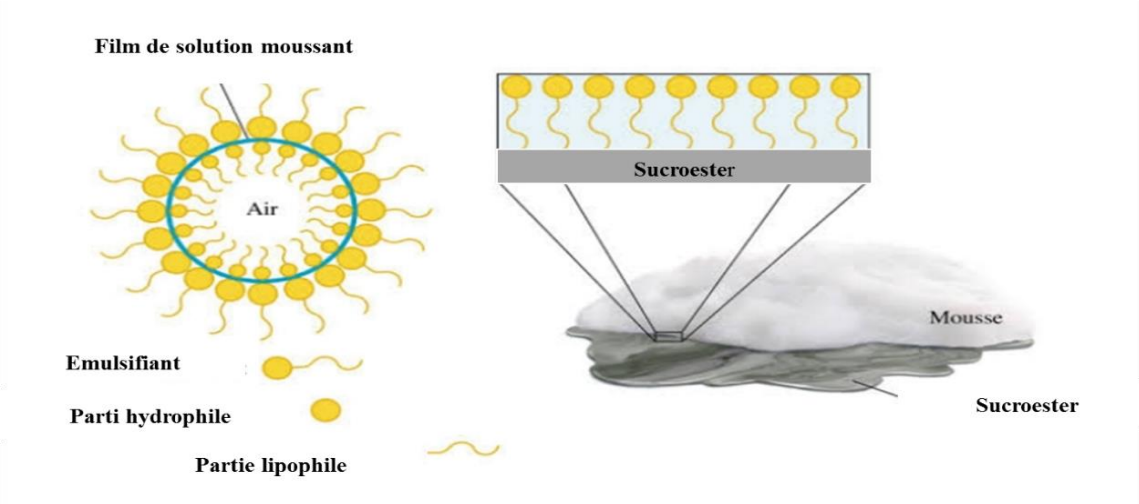


Figure II.8 : Schéma présentant le sucroester comme agent de moussant **[115].**

II.5.1.5 La Solubilité :

Les esters de saccharose, ont des propriétés de solubilité variables en fonction de leur valeur HLB (balance-hydrophile-lipophile) **[91, 116].**

Les esters de saccharose ayant une HLB élevée, sont solubles dans l'eau. Ceux ayant une valeur HLB moyenne sont en partie solubles dans l'eau et en partie dans l'huile/graisse. Plus la valeur HLB est élevée, meilleure est la solubilité dans l'eau **[117, 118].**

Ils sont bien solubles dans l'eau froide, formant des solutions claires. Cependant, certains produits à base d'ester de saccharose disponibles dans le commerce ne répondaient pas aux critères de solubilité établis par le Comité mixte FAO/OMS d'experts sur les additifs alimentaires, produisant une turbidité blanche et/ou des précipités dans l'eau. Le chauffage des échantillons améliore leur solubilité dans l'eau et dans l'éthanol **[119].** Par contre, ils sont caractérisés par leur bonne solubilité dans les solvants organiques, tels que le méthanol et l'éthanol et butanol et le toluène.

II.5.2 Autres propriétés :

En plus de leurs propriétés émulsifiantes, ils possèdent des propriétés stabilisantes, détergentes. Ils sont biodégradables, respectueux de l'environnement, non toxiques compatibles avec la peau, inodores et insipides [**117, 120].** Certains sucroesters présentent des propriétés antimicrobiennes et des propriétés bactériostatiques **[112]**.

II.5.2.1 Propriétés antimicrobiennes :

L'intérêt actuel pour les esters de saccharose est encore renforcé par leur activité antimicrobienne. Ils ont également été utilisés en association avec la nisine pour inhiber la croissance des bactéries Gram-positives **[121].** Comme l'indique **Le tableau II.4.**

Tableau II.4 : Exemples de quelques micro-organismes inhibés par des esters de saccharose **[122].**

Sucroesters	Les micro-organismes qui sont inhibés
Laurate de saccharose	*Bacillus sp* *Spores Alicyclobacillus* *Clostridium sporogenes*
Le stéarate de saccharose	
Le palmitate de saccharose	

II.6 Synthèse enzymatique des sucroesters:

Les esters de sucres sont des émulsifiants qui n'existent pas dans la nature. Leur synthèse s'effectue chimiquement ou par voie enzymatique. En règle générale, le procédé chimique consiste en une estérification effectuée à une température élevée en présence d'un catalyseur alcalin. La source de sucre est le premier substrat requis, suivi d'un chlorure ou d'un anhydride d'acide gras. Ce type de synthèse ne permet de contrôler ni le site de réaction, ni le nombre de groupements hydroxyles qui seront estérifiés. La synthèse chimique génère un grand nombre de sous-produits. Ces dernières doivent être éliminées, ce qui entraîne des coûts d'épuration relativement élevés. Il est important de souligner que malgré ses inconvénients, la méthode de synthèse chimique demeure actuellement envisageable dans le domaine industriel **[3].**

Le tableau suivant présent quelques avantages et inconvénients de la synthèse chimique des sucroesters.

Tableau II.5 : Les avantages et les inconvénients de la synthèse chimique **[91]**

Avantages	Inconvénients
Rapide	Toxicité (solvant et catalyseur)
Bons rendements	Faible sélectivité
Réalisable avec de nombreuses molécules	Température élevée (caramélisation)
Economique	Composition de produit non définie

La synthèse enzymatique est une voie de synthèse plus spécifique. C'est un procédé respectueux de l'environnement, compatible avec les principes de la chimie verte.

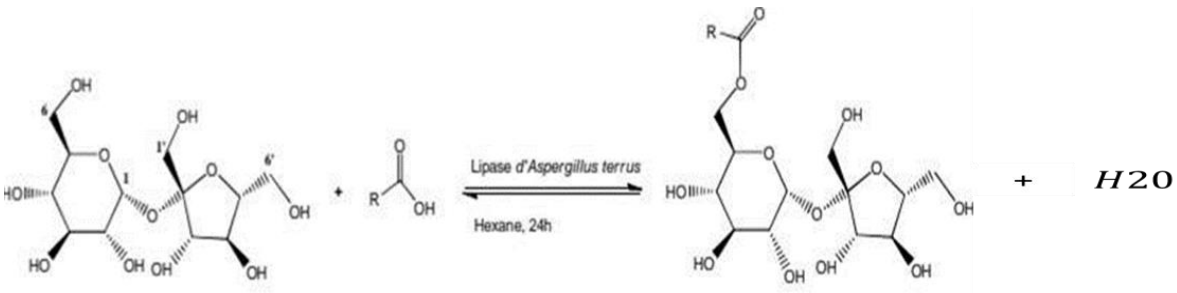
Les enzymes jouent un rôle crucial dans la catalyse des réactions de synthèse, permettant un ciblage précis du site de réaction et la capacité d'opérer dans des conditions réactionnelles modérées (basse température et pression), ce qui contribue à minimiser les réactions secondaires. Les seuls résidus restant après la synthèse enzymatique sont les sucres résiduels et les acides gras **[91].**

Le concept fondamental derrière la synthèse enzymatique consiste à utiliser une enzyme hydrolytique, généralement une lipase, également connue sous le nom de triacylglycérol acylhydrolase, dans un milieu non aqueux (solvant organique) **[123]**.

Les lipases catalysant les réactions d'estérification directe et de Trans estérification lors de la synthèse des sucroesters. Ces réactions se distinguent par la nature du donneur d'acyle (acide gras ou ester d'acide gras) ainsi que par le deuxième produit de la réaction.

II.6.1 Réaction d'estérification :

Rappelons que l'estérification directe mène à la libération d'eau. Pendant l'estérification, les groupes hydroxyle (-OH) du sucre mènent une attaque nucléophile sur le groupe carboxyle (-COOH) de l'acide gras activé par le biocatalyseur (la lipase), conduisant à une réaction de condensation. Cela signifie que l'une des molécules d'eau est éliminée en tant que sous-produit et une liaison estérique est formée entre les deux molécules **[124]. Figure II.9** montre la réaction d'estérification du saccharose avec l'acide oléique en présence de la lipase « d'*Aspergillus terrus* » dans l'hexane.



R : (ch_2)18 Me

Figure II.9 : Estérification enzymatique du saccharose **[125].**

II.6.2 Réaction de Trans estérification :

Lorsque la lipase est utilisée dans la réaction de Trans estérification des sucroesters, elle agit en tant que biocatalyseur en se liant aux substrats, c'est-à-dire le saccharose et les acides gras, formant ainsi un complexe enzyme-substrat. Ce qui facilite la réaction de Trans estérification. Dans cette réaction les groupes ester du saccharose et des acides gras sont échangés, formant le sucroester. Cela implique la rupture des liaisons ester existantes et la formation de nouvelles lisions ester. Une fois que la réaction est terminée, la lipase libère le sucroester synthétisé en tant que produit final de la réaction **[2].** Les étapes générales du mécanisme de la Trans estérification enzymatique peuvent être résumées ainsi :

1. **Formation du complexe enzyme-substrat (ES) :** L'enzyme (lipase) se lie aux substrats, qui sont généralement un ester et un alcool (comme le méthanol ou l'éthanol), pour former un complexe enzyme-substrat.
2. **Acylisation de la lipase :** L'ester se lie à la lipase, formant un complexe acyl-enzyme.
3. **Formation d'un acyloïde :** L'alcool attaque le carbonyl du complexe acyl-enzyme, formant un acyloïde, également appelé ester d'acyl.
4. **Libération de l'acide gras :** L'acyloïde est libéré de la lipase, laissant la lipase régénérée.
5. **Formation du produit d'estérification :** Le produit d'estérification, qui est le nouvel ester formé à partir de l'alcool et de l'acide gras libéré, est maintenant dissocié de la lipase **[126]**

Ce processus peut se répéter, permettant à la lipase de catalyser la Trans-estérification de multiples molécules de substrat. L'avantage de la Trans-estérification enzymatique est sa spécificité et sa capacité à fonctionner dans des conditions douces, ce qui réduit la formation de sous-produits indésirables et la nécessité de purifications coûteuses. De plus, les enzymes peuvent être régénérées et réutilisées, ce qui rend ce processus économiquement attrayant **[126].**

Il est important de noter que la réaction de Trans-estérification catalysée par la lipase est spécifique et sélective. Cela signifie que la lipase favorise la formation du sucroester souhaité tout en minimisant la formation d'autres produits indésirables. Cette spécificité est due à la structure et à l'activité de la lipase **[2]**. **Figure II.10** présente la réaction de transesterfcation de D-glucose avec le vinyle caplate catalysée par la lipase du « *Candida antartica B* » dans l'acétone.

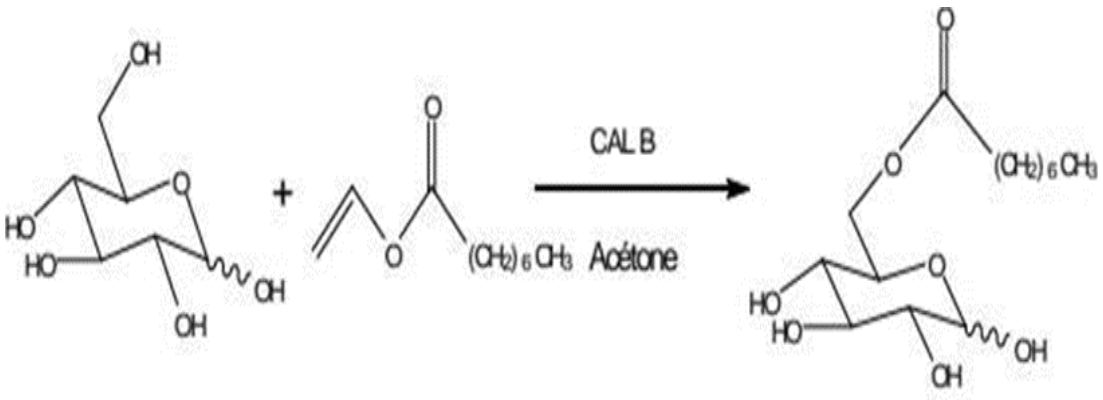


Figure II.10: Transestérification enzymatique du lactose **[127]**.

II.6.3 Facteurs affectant la synthèse des sucroesters catalysé par la lipase dans un solvant organique :

Lors de la synthèse enzymatique des esters de saccharose dans des solvants organiques, plusieurs paramètres affectant la réaction doivent être pris en compte. Afin d'obtenir des taux de réaction et des rendements de conversion élevés dans la synthèse des esters, ces facteurs doivent être étudiés **[86, 128].**

II.6.3.1 Effet des réactifs :

La première étape critique de toute synthèse d'ester de saccharose est la sélection des sucres et des acides gras ou alcools gras dont le produit final sera constitué **[129].**

a. Accepteur d'acyle (sucre) :

Les esters de saccharose, tels que les mono-saccharides, les di-saccharides, les tri-saccharides présentent différents types de sucres qui sont utilisés dans la synthèse enzymatique des sucroesters. Le principal problème de la synthèse des esters de saccharose est la faible solubilité du sucre dans les solvants organiques. Par conséquent, la solubilité du sucre peut être augmentée par une modification dans sa structure. Les sucres modifiés (remplacement des groupes hydroxyle dans les sucres par des groupes alkyle) tels que les sucres méthyliques et les sucres octyliques peuvent augmenter leur solubilité dans les solvants organiques. Cependant, les sucres modifiés comportent plus d'étapes de réaction que les sucres non modifiés, ce qui les rend moins réalisables dans les processus industriels, et ils présentent une certaine toxicité vis-à-vis de l'usage humain **[128]**.

b. Donneur d'acyle (acide gras) :

Lors de la sélection des acides gras pour la synthèse enzymatique, deux propriétés doivent être prises en compte. Le premier est la longueur de la chaîne des acides gras et le second est l'utilisation d'esters d'acides gras **[129]**.

L'effet de la longueur de la chaîne des acides gras (donneur d'acyle) sur l'activité lipasique est difficile à généraliser. Certaines lipases sont très sélectives pour les acides gras à chaîne longue et moyenne, mais d'autres lipases sont sélectives pour les acides gras à chaîne courte et ramifiée. Les acides gras à chaine longue confèrent généralement une meilleure émulsification et une meilleure stabilité de mousse **[89]**.

Les esters d'acides gras, tels que les méthyl éthyles ou les vinyl-esters d'acides gras, présentent plusieurs avantages pour la réaction de synthèse de sucroesters, comme conduire à une réaction de trans-estérification plutôt qu'à une réaction d'estérification [**129]**.

II.6.3.2 Influence de l'eau :

La présence d'eau dans le milieu réactionnel confère à l'enzyme la mobilité fonctionnelle nécessaire à une activité catalytique optimale. Cependant, la présence d'eau est thermodynamiquement défavorable à la réaction de synthèse des esters, mais certaines enzymes, comme la lipase, nécessitent une certaine quantité d'eau pour fonctionner. La quantité d'eau varie en fonction de l'enzyme considérée et du solvant utilisé **[130]**. Par exemple, la lipase B de « *Candida antarctica* » nécessite moins de 0,15 % d'eau pour l'estérification afin d'obtenir des rendements élevés en oléate de xylitol **[131]**.

II.6.3.3 Influence du solvant organique :

Les solvants organiques, en fonction de leur nature (polarité, pouvoir dissociant, volatilité) sont Considérés comme de bons milieux réactionnels pour les réactions enzymatiques à conditions qu'ils soient anhydres et qu'ils permettent une bonne solubilisation des substrats et n'affectent pas l'activité enzymatique **[127]. Le tableau II.6** ci-dessous montre l'influence de la nature du solvant sur le rendement de la réaction d'estérification du di-vinylebutandioate avec le D-Glucose.

Tableau II.6 : Tableau représente l'influence du solvant organique lors de la synthèse enzymatique **[125].**

Sucre	Acide gras	L'enzyme	Solvant	Conditions	Rendement %
Monoester de glucose	Acide oléique	Lipozyme RM IM	DMSO	Temps=2h Température =60°C	67
Saccharose	Acide oléique	Lipase d'*Aspergillus terrus*	Hexane	Temps =24h	47

II.6.3.4 Influence de l'origine et la forme de la lipase :

a. **L'origine de la lipase :** L'origine ou source de lipase influence le rendement de la synthèse enzymatique des esters de sucre **[127]**. La source de lipase peut affecter la réaction de Trans estérification de plusieurs manières :

1. **Activité et spécificité enzymatique** : Les lipases provenant de différentes sources peuvent avoir des activités et des spécificités différentes. Par exemple, les lipases fongiques peuvent avoir une spécificité pour les substrats spécifiques aux champignons, tandis que les lipases d'origine bactérienne peuvent être plus adaptées à d'autres substrats. Par conséquent, le choix de la source de lipase peut influencer la réactivité et la sélectivité de la Trans-estérification.
2. **Stabilité et tolérance aux conditions de réaction** : Les lipases provenant de différentes sources peuvent présenter des niveaux de stabilité variables à différentes

conditions de réaction telles que la température, le pH, et la présence de solvants organiques. Certaines lipases peuvent être plus stables ou plus actives dans des conditions spécifiques, ce qui peut influencer le choix des conditions de réaction optimales.

3. **Coûts et disponibilité** : La disponibilité et le coût des lipases peuvent varier en fonction de leur source. Par exemple, les lipases recombinantes produites par génie génétique peuvent être plus coûteuses à produire, mais peuvent offrir des avantages en termes de pureté et de spécificité. En revanche, les lipases d'origine naturelle peuvent être moins chères mais peuvent nécessiter des étapes supplémentaires de purification.
4. **Compatibilité avec les substrats** : Certaines sources de lipase peuvent être mieux adaptées à des types spécifiques de substrats. Par exemple, certaines lipases peuvent avoir une meilleure activité sur les triglycérides d'origine végétale par rapport à ceux d'origine animale, ou vice versa **[133]. Le tableau II.7** donne des résultats obtenus lors de la synthèse de palmitate de fructose, catalysée par différentes lipases.

Tableau II.7 : Synthèse de palmitate de fructose par différentes lipases **[134]**.

Sucre	Acide gras	La lipase	Rendement(%)
Fructose	Acide palmitique	Novozym 435	53
		Lipozyme IM	30
		Lipase B SP 382	44

b. La forme de lipase:

L'effet de la forme ou du conditionnement de la lipase libre (suspendue en solution) ou immobilisée (fixée sur un support ou en agrégats) dans la synthèse enzymatique de sucroesters est également un aspect important à considérer. Lorsque la lipase est sous forme libre, elle peut être utilisée pour catalyser la réaction de synthèse des sucroesters. Elle peut se lier aux substrats, tels que le saccharose et l'acide oléique, et catalyser la formation des sucroesters. Cela permet d'obtenir des produits de manière plus rapide et efficace. D'un autre côté, elle sera moins protégée contre les fluctuations de pH ou de température ou des concentrations élevées en substrats ou produits.

Lorsque la lipase est immobilisée, elle est fixée sur un support solide, ce qui présente certains avantages dans la synthèse enzymatique de sucroesters. L'immobilisation de la lipase peut améliorer la stabilité de l'enzyme, lui permettant de résister à des conditions plus extrêmes, telles que des variations de pH ou de température, qui peuvent être présentes dans le processus de synthèse. De plus, l'immobilisation permet de réutiliser l'enzyme, ce qui peut réduire les coûts de production.

En conclusion, tant la forme immobilisée que la forme libre de la lipase peut être utilisées dans la synthèse enzymatique de sucroesters. Chacune présente ses propres avantages et inconvénients, et le choix entre les deux dépendra des besoins spécifiques de la synthèse et des contraintes de l'application **[61].**

Tableau II.8 : Effet de la forme de lipase lors de la synthèse enzymatique de sucroesters **[135].**

Sucre	L'acide gras	Solvant	Enzyme	La forme de lipase	Conditions	Rendement %
Fructose	Acide palmitique	Acétone	Novozime SP 435	Immobilisée	72 h	76
	Vinyle d'acétate	Dizopropyle éther	Lipase pancréatique porcine	Granule enrobe	72 h	70

II.6.3.5 Effet de température :

Il est également important d'examiner l'effet de la température sur les réactions enzymatiques. La température de réaction affecte la solubilité des substrats et des produits ainsi que l'activité enzymatique **[136]**. L'enzyme a une température optimale au-dessus de laquelle, il y a risque de perte d'activité suite à la dénaturation, et au-dessous de laquelle, l'activité catalytique diminue et par conséquent la vitesse et le rendement de la réaction.

La lipase « *Novozym 435* » est utilisée comme catalyseur pour la synthèse du dodécanoate de glucose dans les liquides ioniques. L'effet de la température sur le rendement de la réaction montre que lorsque la température est de 55 °C, le rendement en dodécanoate de glucose est le plus élevé. Ces données indiquent que l'enzyme perd son activité à des températures plus élevées **[137]**.

Pour la synthèse enzymatique des esters de glucose, il y'a des recherches qui sont rapportées que lorsque la température de réaction augmentait de 35 °C à 50 °C, l'activité enzymatique augmentait.

Akos et coll. (1998a) ont étudié l'effet de températures comprises entre 5 et 60 °C sur la synthèse sélective du 1,6-diacylfructofuranose en utilisant du Novozym 435 dans de l'acétone. Ces auteurs ont montré que l'augmentation de la température augmente la vitesse initiale et la conversion du fructose. De plus, lorsqu'on augmente la température, on obtient une meilleure sélectivité en monoesters, sans doute due à la solubilité accrue du fructose dans l'acétone **[138].**

II.6.3.6 Effet de temps de contact :

La durée de contact peut jouer un rôle crucial dans la réaction de sucroester, que ça soit dans l'aspect transfert de matière ou dans l'aspect cinétique. Lorsque la réaction se déroule, elle nécessite un certain temps pour que les réactifs interagissent et se transforment en produits. Ce temps de réaction peut varier en fonction de plusieurs facteurs tels que la température, la concentration des réactifs et la présence de catalyseurs.

En général, une augmentation du temps de réaction peut favoriser la formation de produits désirés. Cela peut être dû à une meilleure conversion des réactifs ou à une réaction plus complète. Cependant, il est important de noter que cela dépend également des conditions spécifiques de la réaction. Dans certains cas, une réaction prolongée peut entraîner la formation de sous-produits indésirables ou une dégradation des réactifs **[91].**

II.6.3.7 Rapport molaire (accepteur/donneur) :

Le rapport molaire des deux substrats réactionnels affecte de manière significative la réaction d'estérification. En effet, la solubilité d'un substrat dans le milieu réactionnel est affectée par la concentration des autres substrats, puisque la dissolution du substrat affecte la polarité du milieu réactionnel **[139]**.

Il a été rapporté sur l'effet du rapport molaire sur la synthèse des esters de glucose par la lipase « *Novozym 435* », que l'augmentation de la concentration d'acide myristique a un effet inhibiteur sur la synthèse du myristate de glucose **[140]. Le tableau II.9** résume quelques sucroesters produits par voie enzymatique.

Tableau II.9 : exemples d'esters de sucre produits par voie enzymatique.

sucroester	**Sucre**	**Acide**	**Enzyme**	**Solvant**	**Conditions temps et température**	**Rendement %**	**Réf**
Oleate de fructose	Fructose	Acide oléique	Lipozyme de *Mucor miehei* immobilisée	Méthyle -2 butanol-2	6 h 50°C	50	**127**
Stéarate de glucose	Butyl Glucose	Acide stéarique	Lipozyme R (novo) Immobilisée	n-hexane	3 jours 70°C	80	**125**
Caprylate de fructose	Fructose	Acide caprylique	Lipozyme de *Mucor miehei* immobilisée	Milieu fondu	24h 60°C	25	**141**
Oleate de glucose	Glucose	Acide oléique	lipase de *Candida antarctica*	Benzène et pyridine	48h 55°C	6 à 52	**142**

II.7 Domaines d'application des esters de sucres :

Les esters de sucre et d'acide gras sont vraiment captivants en raison de leurs propriétés physico-chimiques, tensioactives et organoleptiques. Ces tensioactifs sont issus de sources naturelles végétales ou animales, ce qui les rend renouvelables et respectueux de l'environnement. C'est pourquoi on les retrouve de plus en plus dans des applications alimentaires que non alimentaires **[105]**.

II.7.1 Applications dans le domaine alimentaire :

II.7.1.1 Boissons :

Les esters de saccharose sont principalement utilisés comme agents de dispersion et dissolution dans les boissons, leur aspect doit rester inchangé complètement transparent. Ces composés s'adsorbent facilement sur les particules minérales ou vitamines, empêchant ainsi

leur précipitation. Cela nous permet de considérer, par exemple, concevoir des boissons riches en calcium ou des solutions enrichies de vitamines liposolubles, comme la vitamine E.

Aussi, les esters de saccharose peuvent dissoudre et disperser les molécules aromatiques, et les agents conservateurs **[84]**.

II.7.1.2 Mayonnaises :

La stabilisation dans les mayonnaises qui sont également des émulsions de type « huile dans l'eau » est traditionnellement assurée par la lécithine du jaune d'œuf. Au niveau industriel, les sucroesters sont fabriqués à partir d'acide palmitique et utilisés dans la préparation, voire même remplacer en partie le jaune d'œuf **[84]**.

II.7.1.3 Produits laitiers :

Les sucroesters dans ce domaine, sont principalement utilisés pour stabiliser des émulsions "huile dans l'eau", qui sont des produits contenant une phase lipidique discontinue (sous forme de gouttelettes) dans une phase aqueuse continue, comme des laits condensés, la crème pâtissière, la crème chantilly, des glaces. Dans ces deux derniers cas, il y a une phase additionnelle car de l'air a été ajouté, et il est envisageable que les sucroesters interviennent également à l'interface air/eau, créant ainsi une mousse stable.

En plus de leurs caractéristiques émulsifiantes, ces produits ont aussi des propriétés de dispersion des sucroesters et dans le cas des desserts congelés, de leur capacité à stopper la formation de cristaux de glace. De cette manière, la phase de solidification conduit à la formation de cristaux plus petits **[84]**.

II.7.1.4 Pâtes et riz :

En raison de leur teneur élevée en amidon, ces produits ont tendance à former un gel collant lors de leur transformation ou de leur utilisation. En réduisant l'élution de l'amidon dans l'eau, l'ajout d'esters de saccharose permet d'éviter ce phénomène aussi bien au stade industriel qu'aux niveaux de consommation actuels. On évite ainsi une adhérence excessive du mélange à la matière lors de la fabrication des pâtes ou une agglomération des grains de riz lors de la préparation industrielle. Il en va de même pour ce qui est proposé aux consommateurs, comme le riz (antiadhésif) [**84]**.

II.7.1.5 Biscuits :

Durant le processus de fabrication, les esters de saccharose favorisent l'émulsification des graisses et la dispersion des ingrédients. De plus, le mélange ne collera pas trop à la machine. Pendant la cuisson, ils assurent la fermeté des cookies. Ils assurent également de meilleures propriétés sensorielles, et texturales suite à l'uniformité des particules dans les mélanges **[84]**.

II.7.1.6 Produits à base de cacao et de chocolat :

Les esters de saccharose se sont révélés efficaces pour prévenir l'oxydation des graisses, la séparation de l'huile et la cristallisation du sucre. Ils aident également à conserver la forme et l'apparence du chocolat, notamment lorsqu'il est exposé à la chaleur et à l'humidité. De plus, ils contribuent à réduire la viscosité de la qualité du produit **[143]**.

II.7.1.7 Génoises :

L'incorporation de sucroesters simplifie la préparation de ces gâteaux, qui repose principalement sur l'ajout d'air à la pâte, en réduisant le temps de battage requis pour obtenir un taux d'incorporation optimal. Ils ont un impact sur l'expansion de la pâte à un impact positif sur l'obtention de produits plus gonflés et plus tendres. La texture a également été améliorée, l'apparence est plus uniforme. Ces conséquences sont plus prononcées lorsque la HLB est élevée. Toutefois, la manière d'incorporation est cruciale car l'ajout de sucroesters est plus efficace lorsqu'ils sont incorporés sous forme hydratée et en quantité restreinte **[84]**.

Le tableau II.10 donne quelques applications des sucroesters liées à des fonctionnalités spécifiques.

Tableau II.10 : Quelques applications des sucroesters dans le domaine alimentaire **[88].**

Fonction	Application
Emulsification huile / eau	Blanchisseurs pour café, mixes pour crèmes glacées, boissons à base de lait, bonbons
Foisonnement	Crème fouettée
Emulsification eau / huile	margarines, pâte à étaler à base de matière grasse
Solubilisation	Boissons
Modifications cristallines	Margarines, pâtes à tartiner
Activité antimicrobienne	Produit conserve : boissons à base de café et de thé
Lubrification	Bonbons, chewing-gum, biscuits

II.7.2 Applications dans les domaines pharmaceutiques et médicaux :

Les esters de sucre sont privilégiés pour leur utilisation comme émulsifiants dans l'industrie pharmaceutique en raison de leur innocuité pour la peau et les muqueuses. Contrairement aux émulsifiants polyéthoxylés, ces molécules ne réduisent pas l'activité des composés phénoliques et antibiotiques.

La synthèse d'esters de sucre peut également être utilisée dans le domaine médical. En effet, Battaglia et ses collègues **[144].** Ont profité de la présence de transporteurs de glucose dans le sang, en greffant de l'acide kynurénique sur le glucose. La migration de ce dernier du sang vers le cerveau a été améliorée. Cet acide a un potentiel anticonvulsivant. Il a également été démontré que les esters de sucre et l'acide valproïque réduisent l'intensité des crises d'épilepsie **[145].** Par ailleurs, il a été noté que les microémulsions stabilisées par les esters de saccharose constituent des auxiliaires intéressants dans le transport transdermique **[123].**

II.7.3 Détergents :

Il existe deux domaines principaux, les cosmétiques à rincer (shampooing, gel douche, dentifrice et autres produits de lavage et d'hygiène) et les cosmétiques blancs (crèmes pour le visage, lotions, maquillage et autres produits de soins et autres produits de beauté) **[146].**

II.7.4 Produits cosmétiques

Les sucroesters sont très prisés dans les produits cosmétiques en raison de leur nature inoffensive, car ils sont facilement métabolisés, biodégradables et ne provoquent pas

d'allergies ou d'irritation de la peau. Ils ne détruisent pas les lipides de surface et ne perturbent pas le pH de la peau. Leur neutralité permet de les combiner avec d'autres surfactants, ce qui réduit leur agressivité. Les dérivés de saccharose, en particulier les acides gras mono- et long-chaines, possèdent des caractéristiques hydratantes et émulsifiantes exceptionnelles, créant à film lipidique poreux sur la surface de la peau, améliorant la souplesse et procurant une sensation plaisante. On les retrouve fréquemment dans les crèmes et gels, et on les utilise également comme dispersants pour des substances insolubles dans divers produits, tels que les produits de soin des yeux et des lèvres **[84].**

II.7.5 Applications comme fongicides et insecticides :

Les esters de sucre sont biologiquement actifs, Rikhakova et coll ont montré que les esters de saccharose et de glucose ont une activité antimicrobienne. Ceci est particulièrement évident dans le cas des monoesters. Dans ce cas, l'acide gras greffé sur le fragment sucre est l'acide n-dodécanoïque. En utilisant comme modèle les esters de saccharose naturels présents sur les feuilles de tabac, il a été envisagé la synthèse d'esters de sucre ayant une activité insecticide **[147].**

PARTIE EXPERIMENTALE.

INTRODUCTION :

L'objectif de cette partie est de mettre la lumière sur le pouvoir catalytique d'une lipase végétale extraite à partir de graines de Ricin « *Ricinus communis* » dans la synthèse d'un composé à haute valeur ajoutée.

La méthodologie consiste à extraire l'enzyme de la purifier et de la conditionner sous forme immobilisée. Par la suite, une méthode d'optimisation sera adoptée dans le but de sélectionner les conditions les plus favorables pour obtenir un rendement maximal du processus d'acylation du sucre par l'acide gras.

Une fois les conditions optimales pour la réaction de synthèse déterminées, les produits de synthèse sont isolés et purifiés afin que les caractéristiques structurelles et fonctionnelles des esters de sucre puissent être déterminées.

MATÉRIEL

ET

RÉACTIFS

III. MATÉRIEL ET RÉACTIFS:

III.1 MATÉRIEL:

En plus de la verrerie de laboratoire de chimie, les différents appareillages utilisés lors de cette étude sont présentés dans **Le tableau III.1** suivant :

Tableau III.1 : Equipements utilisé au cours de l'étude.

Equipements	La marque de matériel
Agitateurs	BANTE
Centrifugeuse	Hettich
Balance électronique	Sartorius
pH mètre	HANNA instrument
Spectromètre IR	FTIR 8400 SHIMADZU FOURIER
Tensiomètre	KrussGmbH, Germany
Vortex	Heiddolph
Homogénéiseur	IKA modèle T 18 basic (ULTRA TURRAX)
Etuve	Memmert
Microscope optique	Optika

III.2 Réactifs:

Les réactifs utilisés dans cette étude sont les suivants :

III.2.1 Enzyme :

Dans le présent travail, la lipase (EC. 3.1.1.3) utilisée est de source végétale extraite à partir les graines de ricin « *Ricinus communis L* », car elle est facilement isolée par un simple broyage, et elle est capable d'hydrolyser efficacement les triglycérides à longues chaînes d'acide gras (comme acide oléique).

III.2.2 Substrats :

Deux types de réactions enzymatiques ont été étudiés dans ce travail. Selon chaque type de réaction, on cite les réactifs utilisés :

a. Réaction d'hydrolyse :

La réaction d'hydrolyse des lipides a été choisie comme réaction type pour la mesure de l'activité enzymatique de la lipase, la source de lipides est l'huile d'olive.

- **Huile d'olive artisanale :**

L'huile d'olive est principalement composée de matières grasses, à hauteur d'environ 99%. Cette composition en matières grasses est majoritairement constituée de triglycérides, qui sont des esters de glycérol et d'acides gras. Les acides gras présents dans l'huile d'olive varient en types et en proportions. Lorsque des triglycérides sont dégradés, les acides gras qui les constituaient sont détachés et errent librement dans l'huile : ils sont alors dits « Acides gras libres ». Leur pourcentage dans l'huile est ce que l'on appelle « acidité » de l'huile **[65].**

Les caractéristiques typiques de l'huile d'olive sont représenté dans **Le tableau III.2** suivant :

Tableau III.2 : Principales caractéristiques de l'huile d'olive **[148].**

Caractéristiques	Valeurs
point de fumée	210 °C
Densité	0,92 g.cm-3
apport calorique	900 kcals pour 100 grammes
Masse molaire moyenne	278,6 g/mole

Donc nous avons utilisé l'huile d'olive dans notre travail car la lipase de ricin a une affinité élevée pour les huiles végétales riches en acides gras insaturés comme l'huile d'olive **[30].**

- **Solutions tampons :**

pH 7 qui est préparée avec une solution de $\mathbf{KH_2PO_4}$ et de **NaOH**, Donc en utilisant une solution tampon avec un pH de 7 dans le test de l'activité enzymatique de la lipase végétale, cela permet de maintenir un environnement optimal pour l'activité de l'enzyme. Ce pH spécifique permet d'assurer que l'enzyme fonctionne efficacement et libère les acides gras attendus lors du test.

b. Réaction de synthèse :

L'objectif de cette étude est de réaliser la synthèse d'un sucroester. L'oléate de saccharose formé à partir d'acide oléique et de saccharose est pris comme exemple de ce type de synthèses. Les principaux composants du milieu réactionnel sont l'acide gras, le sucre et le solvant :

- **Acide gras :**

- **Acide oléique** $(\mathbf{C_{18}H_{34}O_2})$ **:**

L'acide oléique est le principal acide gras présent dans l'huile d'olive, représentant 55 à 83% de sa composition. Cela en fait une source abondante et renouvelable pour la synthèse de sucroesters qui peuvent améliorer la solubilité et la stabilité des sucrosters. L'acide oléique est un excellent candidat pour la synthèse enzymatique de sucroesters grâce à sa disponibilité dans l'huile d'olive, sa compatibilité avec les sucres en formant des liaisons ester lors de cette synthèse enzymatique. Par ailleurs, les propriétés tensioactives de l'oléate de saccharose est parmi les raisons motivant le choix.

- **Sucre :**

- **Saccharose** $(\mathbf{C_{12}\ H_{22}O_{11}})$ **:**

Notre sucre de table habituel, est un disaccharide constitué d'une unité de glucose et d'une unité de fructose. Extrait de certaines plantes, principalement de la canne à sucre et de la betterave sucrière, il est très largement utilisé dans différents domaines (alimentation et la synthèse organique). En raison de sa structure moléculaire, le fragment polaire de saccharose sert d'extrémité hydrophile ce qui le rend soluble dans les solvants polaires.

- **Solvant :**

- **Acétone ($C_3 H_6 O$) :**

L'utilisation de l'acétone comme un solvant dans la synthèse d'esters de saccharose offre des avantages significatifs en termes d'extraction, de purification, de rendement élevé, vu ses propriétés physico-chimiques compatibles avec la synthèse.

Tableau III.3 : Réactifs chimiques utilisées au cours de la synthèse de surcroester.

Réactifs	**Fournisseur**	**Masse molaire (g/mol)**	**Température d'ébullition (°C)**	**Densité (g/ml)**	**Solubilité**
Acétone	Riedelde Haën.	58,08	56.05	0.78	Soluble dans l'eau
Acide oléique	Laboratoires Humeau	282,46	194	0.89	soluble dans huile d'olive
Saccharose	Riedel de Haën.	342,2965	100	1.58	Soluble dans l'eau

PARTIE « A » :
Préparation de la Lipase

III.3 MÉTHODES EXPÉRIMENTALES :

III.3.1 Préparation de la lipase :

Afin d'utiliser la lipase de « *Ricinus communis L* » dans cette étude, il est nécessaire de mener une série d'étapes préparatoires, commençant par l'extraction et la purification, et se terminant par la mise en évidence et la mesure de l'activité.

III.3.2 Extraction de la lipase brute :

Les graines de ricin décortiquées ont été broyées à l'aide d'un pilon et d'un mortier. Ensuite, le mélange obtenu est filtré à travers une bande à gaz pour éliminer les grosses particules peu ou mal broyées. Le produit final de ce processus est un extrait enzymatique brut de lipase. Les étapes de broyage, de filtration d'extrait enzymatique sont représentées sur **La figure III.1** :

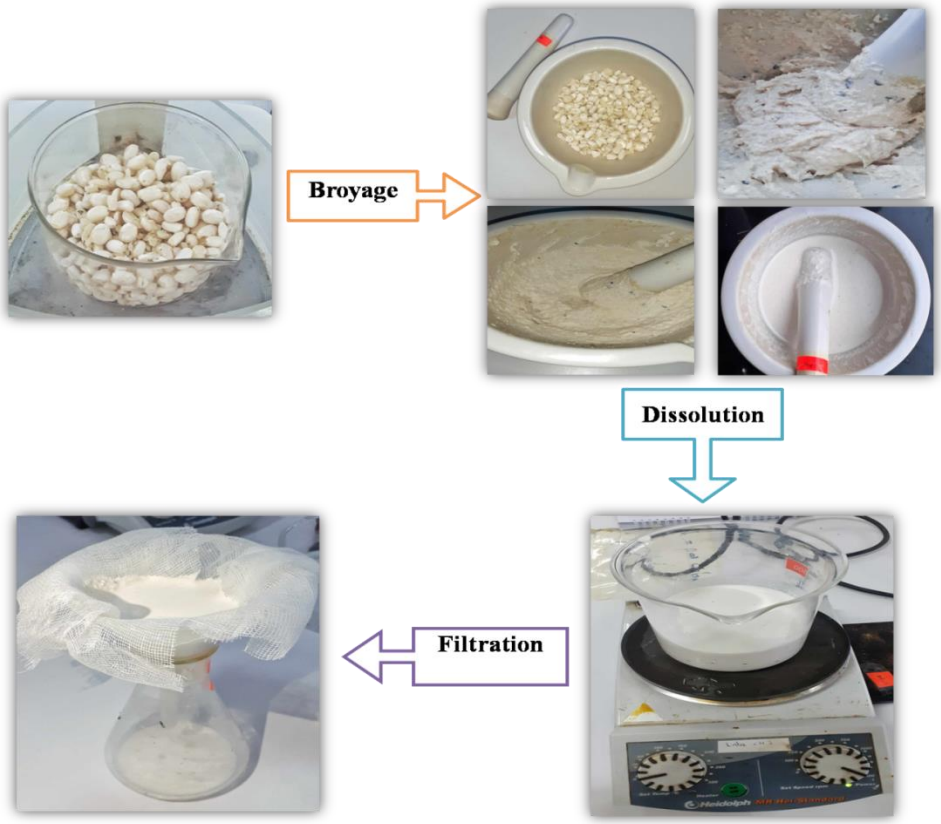


Figure III.1 : Protocole de préparation de la lipase de Ricin.

III.3.3 Purification partielle de la lipase :

Pour obtenir un extrait enzymatique pur, l'extrait brut subira un processus de purification pour éliminer tout contaminant ou substance potentiel susceptible de provoquer

des modifications (comme les lipides, les protéines, les sels minéraux, etc.…). Parmi les différentes méthodes disponibles pour la séparation des protéines et des enzymes, la précipitation à l'aide de solvants organiques est une approche simple et couramment utilisée.

L'acétone a été choisie comme un agent de précipitation puisque il est relativement peu couteux et il est disponible sous une forme pure avec peu de contamination qui peut inhiber ou empoisonner l'enzyme **[150].**

- **Mode opératoire :**

- L'extrait brut de lipase a été partiellement purifié par précipitation à l'acétone.
- Toutes les étapes d'isolement enzymatique ont été réalisées à 4 ° C.
- Trois volumes d'acétone glacée sont ajoutés goutte à goutte à un volume de solution aqueuse de lipase brute, laissée sous agitation dans un bain de glace pilée.
- Une fois complètement rempli d'acétone, laisser le mélange (extrait brut acétone) au réfrigérateur à 4 °C pendant 2 h, Il se forme alors un précipité blanc.
- Sa récupération se fait par centrifugation à 3000 tr/min pendant 10 minutes.
- Le culot résultant a été séché à température ambiante et la poudre résultante était un extrait enzymatique de lipase partiellement purifiée (EEPP).

Les lipases semi-purifiées sont souvent stables et doivent généralement être conservées dans des récipients en verre, étroitement enveloppés dans du papier d'aluminium et dans des conditions qui les protègent de la dégradation chimique et biologique. La lipase partiellement purifiée peut être conservée à 4°C au réfrigérateur pendant plusieurs semaines **[151].**

Les étapes de purification sont récapitulées dans **La figure III.2** :

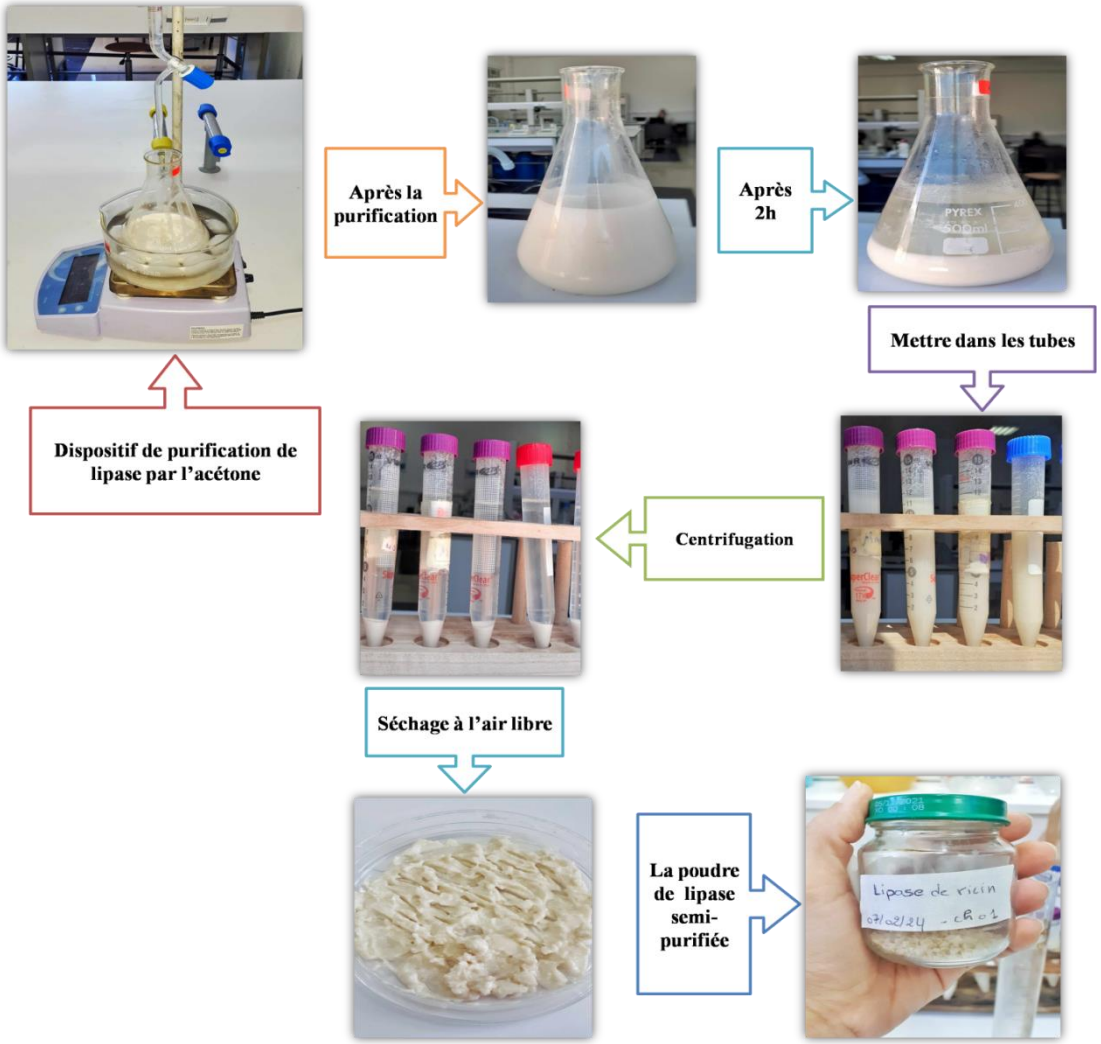


Figure III.2 : Technique de purification partielle de la lipase brute par précipitation à l'acétone.

III.3.4 Mesure de l'activité enzymatique :

L'activité lipasique (AL) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire (1mmol) d'acides gras libres par minute à partir de l'hydrolyse des corps gras. Elle est déterminée par titrage d'émulsions d'huile d'olive **[152].**

Le test de la lipase est réalisé dans des conditions standards (température ambiante, pH = 7) et le milieu réactionnel utilisé est préparé selon les étapes suivantes **[153] :**

Dans deux erlenmeyers introduire :

- 0,5 ml $CaCl_2$ (0,02 M),
- 3 ml solution tampon pH 7,
- 5 ml d'huile d'olive,

→ Le premier erlenmeyer est utilisé comme un témoin,

→ et on ajoute dans le deuxième erlenmeyer 0.5g de lipase,

- Déclencher la minuterie après l'injection de 0.5 g de lipase Après 30 min stopper la réaction en ajoutant 5 ml d'un mélange acétone/éthanol (vol/vol),
- Ajouter quelques gouttes d'indicateur coloré (phénolphtaléine),
- Titrer le milieu avec une solution de NaOH (0,1 M),
- L'activité enzymatique sera déterminée par la relation suivante :

$$AE = (Ve - Vt) * C * 1000 / t \quad \text{.....(Eq.1)}$$

Avec :

AE : activité enzymatique (µmol /min) ou (UI)

Ve : volume de NaOH avec catalyseur (ml).

Vt : volume de NaOH sans catalyseur (ml).

C : concentration de NaOH (M).

t : temps de réaction par (min)

Remarque : Cette grandeur peut être rapportée à la masse d'enzyme utilisée pour obtenir l'activité massique.

On aura donc : **AEm = AE/m (UI/g)**

III.3.5 Préparation de la lipase immobilisée :

Compte tenu des coûts de purification parfois élevés, l'immobilisation d'enzymes est une solution idéale pour rendre économiquement viable l'utilisation des enzymes. D'autre part, la réutilisation et la stabilisation des enzymes sont des facteurs importants pour une mise en œuvre de procédés en continu à l'échelle industrielle **[153].**

Les techniques d'immobilisation consistent à encapsuler l'enzyme dans un support semi-perméable qui empêche l'enzyme de quitter le support tout en permettant le passage du substrat et du produit, L'incorporation d'enzymes dans des polymères d'alginate est l'une des méthodes classiques pour immobiliser les enzymes, Il s'agit d'une technologie qui retient les enzymes tout en les imprégnant dans le substrat, L'alginate est un matériau non toxique,

rentable et polyvalent doté d'une stabilité thermique améliorée ainsi que d'une stabilité enzymatique et de propriétés fonctionnelles.

La réticulation des molécules d'alginate de sodium en présence de l'agent réticulant l'ion calcium (Ca^{+2}), conduit à la gélification du mélange. L'efficacité de l'immobilisation de la lipase dépend des concentrations de ces deux constituants.

Dans cette étude, l'alginate de sodium a été utilisé pour immobiliser la lipase de Ricin en présence de cations calcium **[154].**

- **Mode opératoire :**

L'immobilisation de la lipase de « *Ricinus communis* » par confinement dans l'alginate de calcium a été réalisée à température ambiante, selon le protocole suivant :

- dissolution sous agitation de 0.2 g de l'alginate de sodium dans 10 ml de solution enzymatique (0.5 g de la lipase dans10ml d'eau distillée),
- Le mélange lipase/alginate de sodium est agité jusqu'à formation d'une solution homogène visqueuse,
- Laisser le mélange pendant 30 min pour éviter les bulles d'air, qui feraient flotter les billes à la surface de la solution de $CaCl_2$,
- Verser goutte à goutte le mélange lipase/alginate dans 50 ml de solution de $CaCl_2$(0,2M) à l'aide d'une seringue10 ml,
- Les perles se forment rapidement et sont agitées pendant 1 heure,
- Les billes ont été collectées, rincées à l'eau distillée et conservées à 4°C dans un tampon pH = 7.0,
- Les sphères formées sont de la lipase immobilisée,

La figure III.3 ci-dessous récapitule toutes les étapes d'immobilisation :

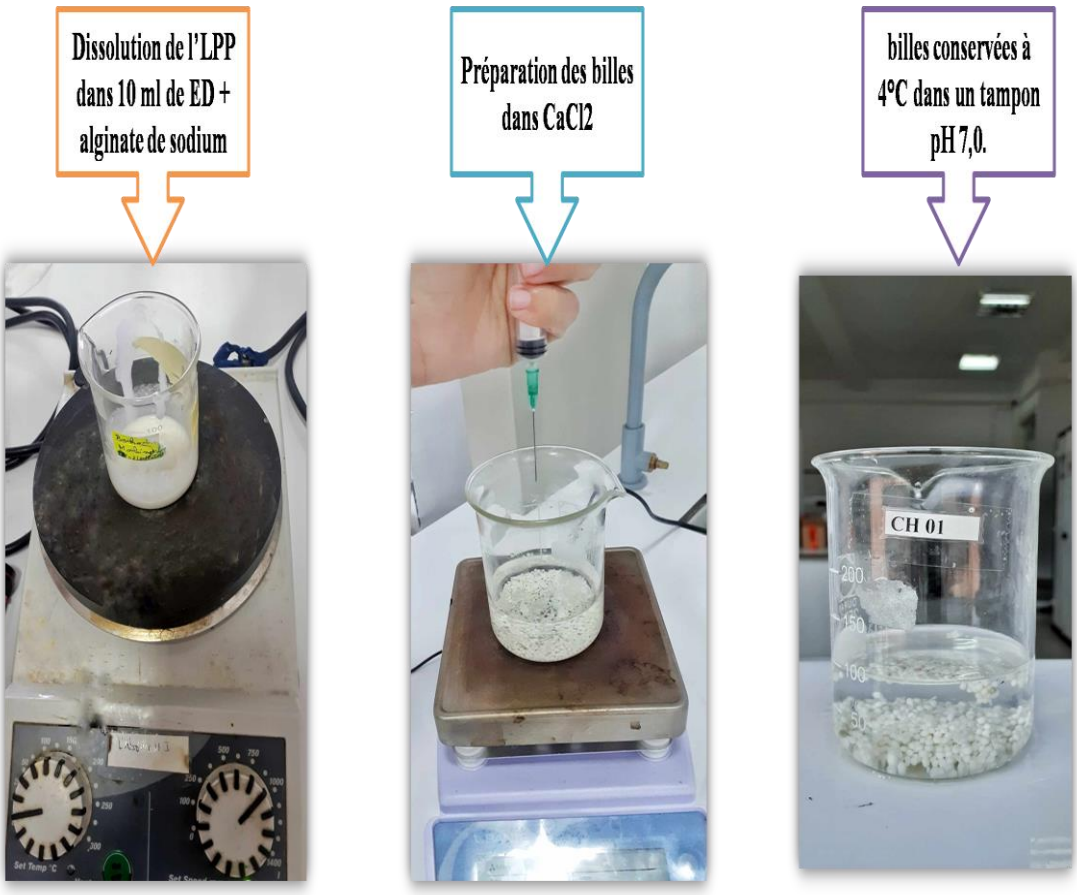


Figure III.3 : Étapes d'immobilisation de la lipase dans l'alginate de calcium.

III.4 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS :

III.4.1 Mise en évidence de l'activité lipasique :

L'activité enzymatique de la lipase est essentielle pour catalyser l'hydrolyse des esters glycéridiques en milieu aqueux. Les lipases sont des enzymes hydrosolubles, sont spécialisées dans la transformation des glycérides à longue chaîne en glycérol et acides gras, jouant un rôle crucial dans le métabolisme des triglycérides. Elles sont actives sur une large gamme de pH et de températures, conservant une activité significative à des valeurs variées. Expérimentalement, la recherche d'une fonction enzymatique peut être réalisée par l'observation de la disparition d'un substrat ou de l'apparition d'un produit **[2].**

Les méthodes de dosages d'activités lipolytiques sont variées. Chacune de ces techniques peut être appliquée à des besoins précis. Il faut prendre en compte la sensibilité du test, la disponibilité du substrat, son coût et la facilité de la mise en œuvre du dosage **[155].**

Pour notre cas, la méthode de dosage titrimétrique pour le dosage des acides gras libérés après hydrolyse parait être la plus appropriée.

Activité enzymatique de la lipase semi-purifiée : réalisée dans des conditions standard (température ambiante, pH = 7)

AE = 15 µmol/min ou 15UI

Remarque : La valeur obtenue est l'activité initiale pour 0.5g de poudre de lipase de ricin.

Ce qui correspond à **AEm = 30UI/ g de lipase**.

Après conservation pendant quelques jours, il a été constaté que l'activité avait diminué jusqu'à **12UI**, ce qui pourrait être dû à :

- Inactivation partielle de l'enzyme par le milieu : suite au changement des conditions optimales de température, pH etc.….
- Instabilité de l'enzyme : suite aux changements brusques de température entre le lieu de conservation et les conditions au sein du laboratoire.
- Dégradation enzymatique : Les enzymes peuvent être dégradées par d'autres enzymes protéolytiques présentes dans le milieu, ce qui réduit progressivement leur concentration active.

FU ET COLL. (1995) ont démontré que d'autant plus qu'une huile contient des acides gras insaturés, plus l'hydrolyse des triacylglycérols n'est rapide. L'huile de soja et l'huile

d'olive (qui sont hautement insaturées) s'hydrolyse plus rapidement que les autres huiles. Compte tenu de leur facilité d'hydrolyse, les huiles hautement insaturées permettent une hydrolyse complète en utilisant des concentrations d'enzymes et des temps de réaction réduits **[30].**

III.4.2 Purification partielle de la lipase :

L'objectif de la progression de la purification est d'atteindre une activité maximale et une pureté maximale de l'enzyme. Alors, plus l'enzyme est pure, plus l'activité spécifique est élevée .Il est très important d'éliminer les molécules contaminées à partir du mélange complexe pour exclure l'enzyme pure en utilisant une méthode appropriée car les activités des enzymes purifiées sont considérées comme plus importantes à des fins biotechnologiques **[155].**

Le facteur de purification est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique (par rapport à la première étape).

L'enzyme a été caractérisée pour vérifier les conséquences de la température, du pH, du substrat et des activateurs ou inhibiteurs sur la stabilité de l'enzyme **[156].**

Parmi les différentes méthodes disponibles pour la séparation des protéines et des enzymes, la précipitation à l'aide de l'addition d'un solvant organique neutre (non chargée) miscible à l'eau en particulier le méthanol, l'éthanol, le butanol et l'acétone. Ce qui diminue la solubilité dans l'eau de la plupart des protéines globulaires de telle sorte qu'elles peuvent précipiter dans la solution (risque de dénaturation).Le rôle du solvant est d'affaiblir la liaison entre l'eau et la protéine et encourager donc les liaisons entre protéines qui s'agglomèrent et précipitent **[86].**

III.4.3 Préparation de la lipase immobilisée

La lipase est attachée au maillage du gel d'alginate de calcium et l'enzyme est ajoutée avant que le gel ne polymérise. Cette technique d'immobilisation du complexe d'inclusion est généralement plus stable lorsque l'enzyme est piégée dans le réseau tridimensionnel de la matrice. La grille de la matrice assure la rétention des enzymes de manière purement physique et permet la diffusion du substrat. Les billes ainsi obtenues sont sphériques, rigides et stables chimiquement et mécaniquement. Leur diamètre moyen est de 3,5 mm.

L'alginate de sodium est un polymère constitué d'unités répétitives régulières appelées monomères (formule chimique $\mathbf{Na}\boldsymbol{C_6H_7O_6}$) liées entre elles pour former des chaînes.

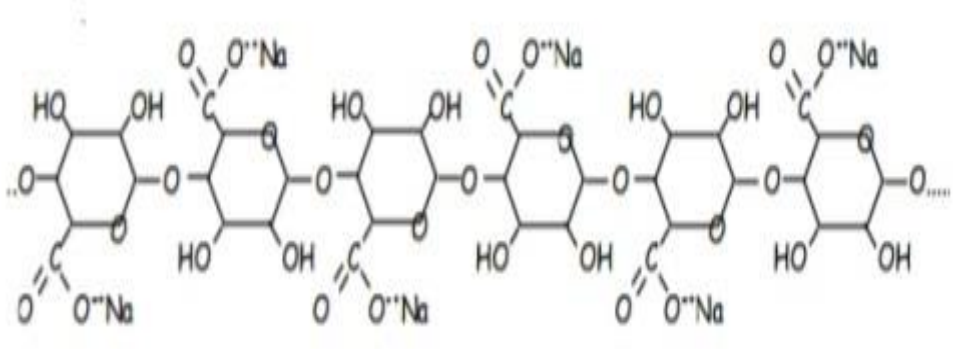


Figure III.4 : Structure de polymère d alginate de sodium.

L'alginate de sodium est donc une longue chaine comportant beaucoup de charges négatives par la présence de groupements carboxyles CO_2^-dont la charge est contrebalancée par la charge positive de l'ion sodium Na^+afin d'avoir une molécule neutre.

Lorsque l'alginate de sodium rencontre le calcium, les ions calcium Ca_2^+déplacent les ions sodium. Les ions calcium sont divalents (doublement chargés positivement) et chaque ion calcium peut interagir avec deux charges négatives et donc avec deux groupes CO_2, formant ainsi un réseau et une agrégation ultérieure, car les ions calcium peuvent le relier à deux chaînes d'alginate. En effet, le calcium va se déplacer vers le centre de la sphère si bien qu'à la longue la sphère va se gélifier complètement. La polymérisation des chaînes d'alginate forme un gel et le liquide contenant l'alginate s'épaissit et durcit, c'est ainsi que se forme la peau flexible à la surface de nos sphères **[65].**

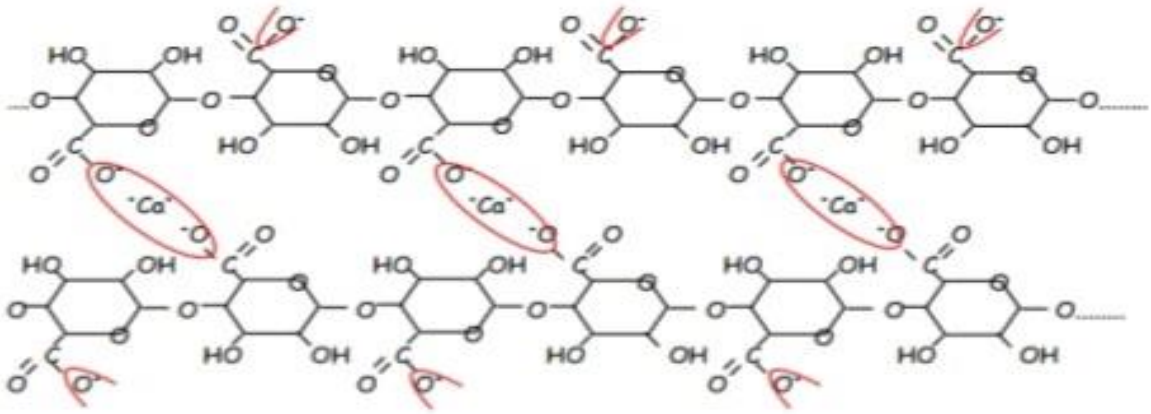


Figure III.5 : Structure des polymères alginate de calcium.

Le chlorure de calcium agit comme gélifiant et les billes deviennent durs. Un film de gel se forme immédiatement à la surface de la gouttelette et s'épaissit vers l'intérieur. En effet, le

calcium va se déplacer vers le centre de la sphère si bien qu'à la longue la sphère va se gélifier complètement. Nous avons donc obtenu des sphères à noyau liquide donc une concentration de 0,5 M est suffisante pour une activité enzymatique maximale de la lipase immobilisée.

Pour la suite de l'étude, l'immobilisation de la lipase de « *Ricinus communis* » a été effectuée en utilisant une concentration de 0.2M d'alginate de sodium comme support d'immobilisation gélifié dans 0.5 M de chlorure de calcium.

Plusieurs études ont évalué l'efficacité de l'immobilisation de la lipase (MALCATA et *al*. 1990 ; Malcata et *al.* 1991 ; LILJA-HALLBERG et *al*., 1995 ; BALCÃO et *al*., 1996 ; WEN-WEI et *al.*, 2005). En 1996, SANCHEZ et *al*. Le comportement cinétique de la lipase cylindrique soluble de Candida a été comparé à des formes immobilisées sur différents supports. Les enzymes immobilisées catalysent l'hydrolyse et l'estérification, ont une meilleure affinité pour leurs substrats, mais sont plus lentes que les enzymes libres.

PARTIE « B » :

Application de la lipase dans la Synthèse d'un sucroester

IV. Méthodes expérimentales:

L'application de la catalyse enzymatique dans les procédés chimiques présente plusieurs avantages. Il réduit l'utilisation de produits dangereux dans l'environnement, réduisant ainsi les coûts d'élimination. Les enzymes offrent également des avantages distincts en raison de leur spécificité, de leur biodégradabilité et de leurs limites en matière de formation de sous-produits. Pour que les enzymes soient des catalyseurs industriels fiables et durables, elles doivent répondre à certains critères, les enzymes doivent être compatibles et stables. Au niveau fonctionnel, la stabilité des enzymes limite souvent leurs applications pratiques. D'un point de vue industriel, les biocatalyseurs immobilisés présentent une stabilité prouvée **[157].**

IV.1 Synthèse d'un sucroester :

Dans notre travail, on s'intéresse à la synthèse des esters de saccharose comme produit a haute valeur ajouté, issu d'une réaction d'estérification entre le saccharose et l'acide oléique, en présence de la lipase du « *Ricinus communis* » immobilisée dans l'alginate de sodium dans un milieu organique et sous des paramètres contrôlés de température et de temps. La réaction de synthèse présentée dans **La figure IV.1**, est une réaction équimolaire (1 mole Sucre + 1 mole d'acide gras).

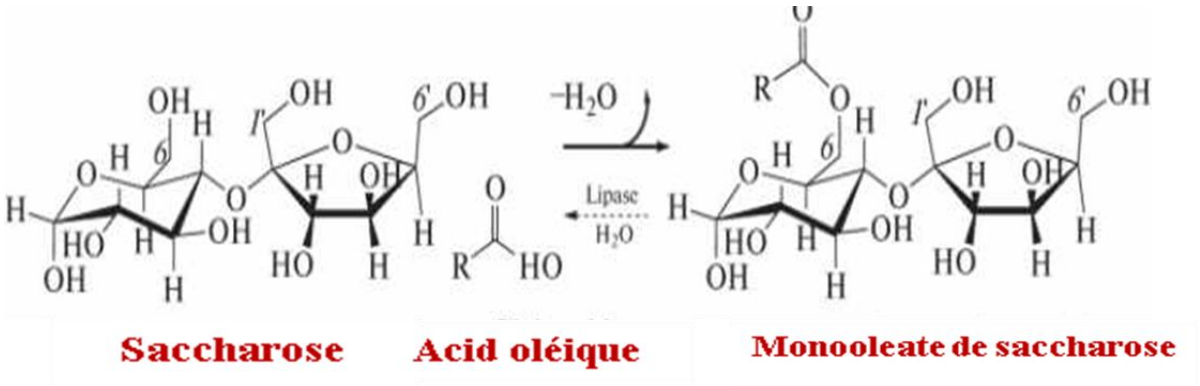


Figure IV.1 : Schéma de réaction d'estérification de saccharose **[135].**

L'acylation enzymatique du saccharose avec l'acide oléique implique une réaction d'estérification catalysée par la lipase immobilisée du « *Ricinus communis* ».

Pendant l'estérification, les groupes hydroxyle (-OH) du saccharose impliquées dans une attaque nucléophile sur le groupe carboxyle (-COOH) de l'acide oléique activé, subissent une réaction de condensation. Cela signifie que l'une des molécules d'eau est éliminée en tant que sous-produit, et une liaison ester est formée entre les deux molécules. Ce Processus

Aboutit à la formation de l'oléate de saccharose. Ce produit est un tensioactif non ionique caractérisé par des propriétés uniques et utilisés dans divers application industrielles **[124].**

Pour optimiser la performance du processus d'acylation, les effets de différents paramètres, tels que la nature de donneur d'acyle (sucre), le rapport molaire de réactifs et l'activité enzymatique de la lipase, ont été analysés pour déterminer les conditions optimales de la réaction.

IV.2 Optimisation de la synthèse d'ester de saccharose :

Plusieurs expériences ont été menées afin de fabriquer un ester de saccharose, afin d'obtenir un taux élevé d'ester de saccharose, les paramètres du procédé ont été améliorés en utilisant des expériences mono-factorielle, c'est-à-dire en étudiant l'effet d'un seul facteur à la fois, afin de déterminer la valeur optimale et de la fixer comme valeur pour la suite de l'étude. Les facteurs et les intervalles de l'étude sont présentés dans **Le tableau IV.1 :**

Tableau IV.1 : Représentation des différents facteurs de réaction et leurs valeurs

Les facteurs	Les valeurs
Le solvant (acétone)	5 ml
donneur d'acyle (acide oléique)	0.5 à 2 mmol
Activité de l'eau (AE)	0,099 à 0.35
Température	25 à 60 °C
temps de réaction	30 min à 3h
Agitation vitesse	400 tr/min.
lipase	0.25 à 1.25 g
Rapport molaire (d'accepteur acyle : donneur d'acyle (mmol/mmol)	$^1/_{0.5}$ à $^1/_2$

➢ **Mode opératoire de la synthèse :**

- Dans un Erlenmeyer fermé par un bouchon en verre,
- Un mélange équimolaire (1mmol) d'acide oléique et de saccharose a été dissous dans 5 ml de solvant organique (acétone),
- L'activité initiale de l'eau (AE) du mélange réactionnel a été ajustée à 0.099,
- Après avoir ajouté la lipase immobilisée, le mélange réactionnel a été agité avec un agitateur magnétique à 50 °C pendant 2 h.**[65]**

La figure IV.2 Représente le montage de synthèse d'ester de saccharose.

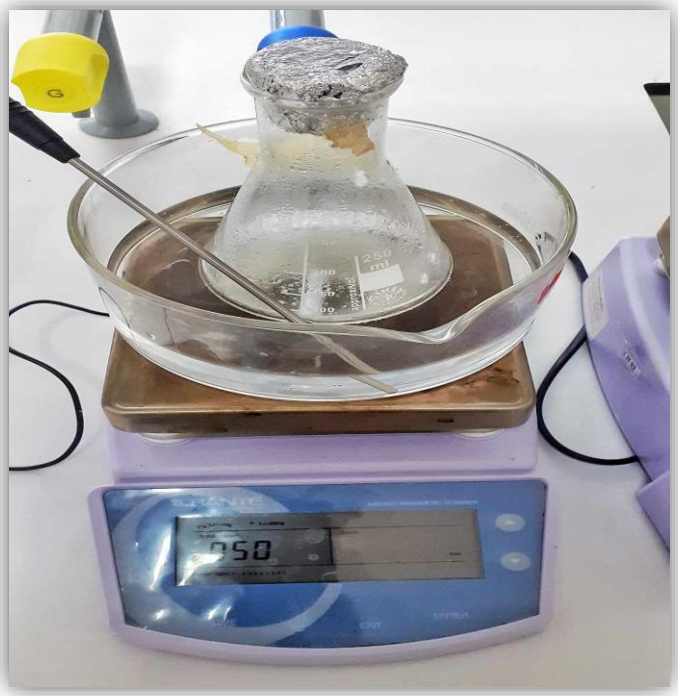


Figure IV.2 : Montage de synthèse d'ester de saccharose.

IV.3 Rendement d'acylation :

L'avancement de la réaction d'acylation (réponse d'optimisation) a été suivi en mesurant le taux de conversion des acides gras. La concentration décroissante en acides gras est estimée par la méthode de titrage à la soude NaOH (0.1 M) en présence de phénolphtaléine [**158].**

→ **Expériences en double** : Chaque expérience a été répétée deux fois pour garantir la fiabilité des résultats.

→ **Tests blancs :** Des tests de contrôles (sans enzyme) ont été réalisés pour déterminer l'acylation non enzymatique.

→ **Calcul du rendement :** Le pourcentage de conversion des acides gras en produits acylés a été déterminé par l'équation suivante **(Eq.1)** :

$$\textbf{Conversion d'acide gras (\%)} = \frac{(nt - ne) * 100}{ni} \quad \text{..... (Eq.1)}$$

Avec :

nt : nombre de moles d'acide gras du témoin (mmole).

ne : nombre de moles d'acide gras résiduel (mmole).

ni : nombre de moles initiale d'acide gras (mmole).

IV.4 Résultats et discussion :

IV.4.1 Le choix de solvant :

Avant de lancer la synthèse, il nous a semblé important de déterminer le meilleur solvant, notamment au niveau de la solubilisation des substrats. Le problème associé au choix est que le solvant doit à la fois solubiliser le sucre (polaire), l'acide gras (apolaire) ainsi que l'enzyme sans la dénaturer. En effet, en présence de certains solvants l'enzyme peut être dénaturée, ou partiellement inhibée, provoquant ainsi une diminution de la productivité et du rendement final de conversion des substrats. D'autres critères peuvent dicter ce choix tels que : la faible toxicité, la stabilité chimique et le cout.

Notre choix s'est porté sur l'acétone, l'un des solvants organiques les plus utilisés dans la synthèse des sucroesters pour dissoudre les réactifs et favoriser la réaction chimique. Car il à l'avantage de solubiliser de manière particulièrement rapide le sucre et l'acide gras, et parce qu'il est miscible avec l'eau. Il agit en tant que milieu réactionnel pour permettre la formation des esters de sucre et d'acide gras. D'un autre côté, d'après certaines études, il a un effet dénaturant limité vis-à-vis de la lipase de ricin. D'ailleurs il est fréquemment utilisé durant la phase de purification pour l'obtention de poudre de lipase **[86].**

Contribuant ainsi à la production efficace de ces composés pour différents secteurs, l'acétone est un solvant volatil qui peut être facilement éliminé après la réaction, permettant ainsi d'obtenir des sucroesters purs. De plus, l'acétone a la capacité de dissoudre à la fois les réactifs et les produits, facilitant ainsi la réaction chimique. Son utilisation peut également

favoriser la réaction en diminuant la viscosité du mélange réactionnel, ce qui peut améliorer le rendement de la synthèse **[61].**

IV.4.2 Choix du sucre adéquat :

Le choix du sucre dans la synthèse des sucroesters est un paramètre important qui dépend de la solubilité du sucre, du type de sucre (saccharose, glucose, fructose, maltose...) et du nombre de groupes estérifiés souhaités pour obtenir les propriétés désirées **[91].**

Pour avoir l'effet de la nature de sucre sur la conversion de l'acide oléique, quatre expériences ont été réalisées avec l'ajout de différents types de sucres disponibles dans le laboratoire de chimie.

Les résultats des expériences sont présentés dans **La figure IV.3 :**

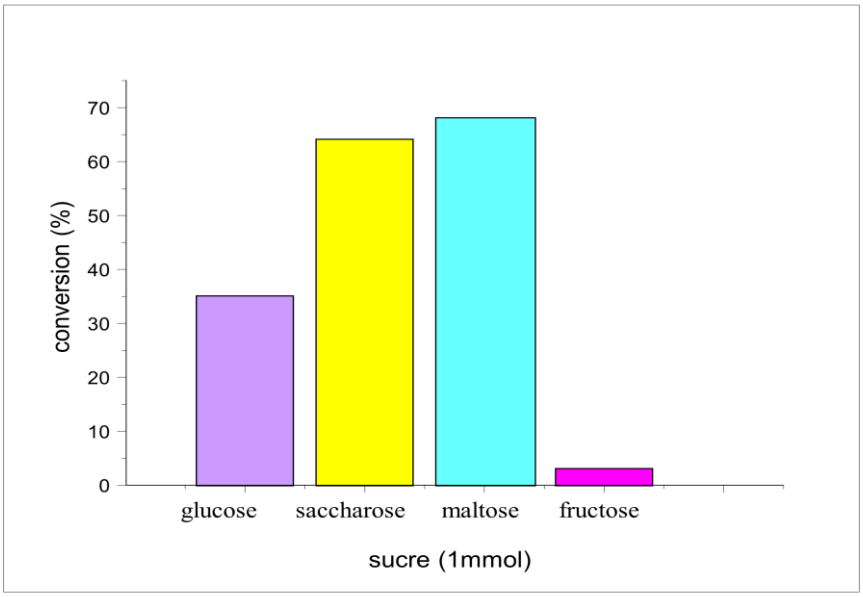


Figure IV.3 : Effet de la nature de sucre sur le rendement d'estérification de l'acide oléique en présence de la lipase de ricin.

Condition de réaction : Sucre = 1 mmol, Acide oléique = 1 mmol, a_w = 0.099, Masse de lipase immobilisée = 0.5 g, Agitation = 400 rpm, t = 2 h, T = ambiant, Acétone = 5 ml.

⇒ **Discussion des résultats :**

La conversion la plus élevée de l'acide oléique a été obtenue avec le **maltose**, **68%**, comme accepteur d'acyle, après 2 heures, alors que presque aucun produit n'a été détecté avec

le fructose. Ces résultats peuvent être liés à plusieurs facteurs. Mais nous avons choisi **le saccharose (64%)** car il peut être facilement dissous dans l'eau tout en maintenant une structure stable. Cela facilite son utilisation dans les procédés de synthèse. Il sert d'intermédiaire chimique pour de nombreux agents émulsifiants et détergents. Les esters de saccharose présentent des propriétés conservatrices d'où la tendance à utiliser le saccharose dans la synthèse de sucroester à grande échelle **[91].**

En comparaison, le maltose est un disaccharide composé de deux molécules de glucose liées par une liaison glycosidique. Bien qu'il soit soluble dans l'eau, il n'est pas aussi abondant et bon marché que le saccharose. De plus, les propriétés techniques du maltose dans la synthèse de sucroester ne sont pas aussi bien documentées que celles du saccharose.

D'autres sucres comme le fructose, le mannitol, le sorbitol et la sorbose sont aussi utilisés pour la synthèse de sucroester, mais le saccharose reste le plus avantageux en termes de disponibilité, de coût et de propriétés **[160].** La nature du sucre peut également avoir un effet sur les propriétés tensioactives du sucroesters. Ainsi, il a été reporté que plus le HLB de sucroester est élevée plus il peut abaisser les tensions superficielles air/eau.

Par conséquent, le **saccharose** a été fixé comme accepteur d'acyle pour la suite de notre étude.

IV.4.3 Effet du rapport $n_{\text{saccharose}}/\ n_{oléique}$:

L'effet des rapports molaires saccharose/acide oléique allant de 1/0,5 à 1/2 sur la production de notre produit de l'oléate de saccharose a été étudié sous des conditions contrôlées.

Les résultats seront affichés en **La figure IV.4** :

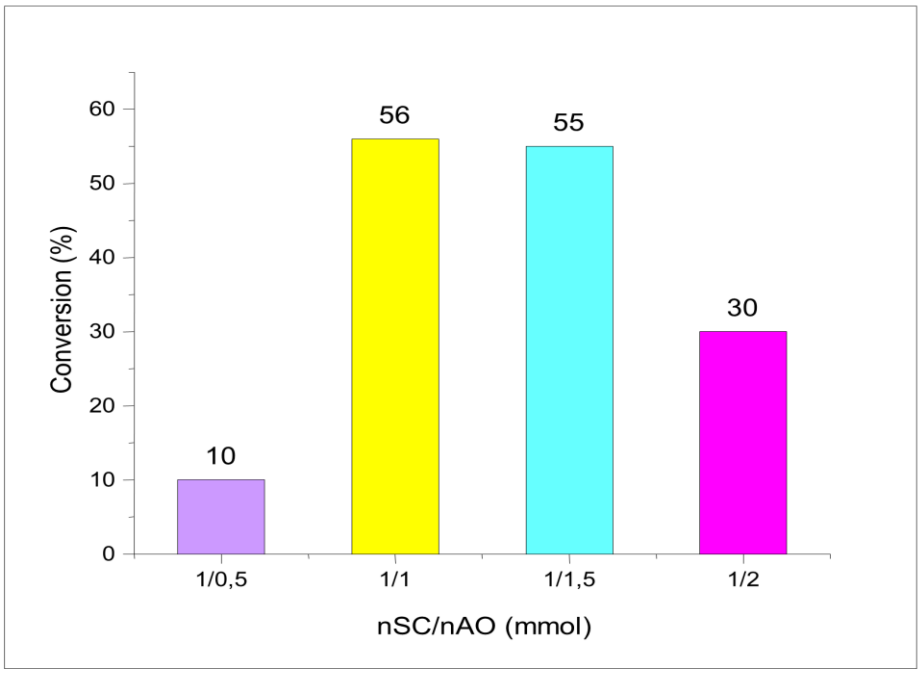


Figure IV.4 : Effet du rapport molaire sur la conversion d'acide oléique par la lipase de ricin.

Condition de réaction : **Saccharose/Acide oléique = 1/0,5 à 1/2 mmol**, a_w = 0.099, Masse de lipase immobilisée = 0.5 g, Agitation = 400 rpm, t = 2 h, T = ambiant, Acétone = 5 ml.

⇒ **Discussion des résultats :**

Le rapport molaire des deux substrats a un impact significatif sur l'efficacité de conversion de l'acide oléique. Après 2 heures, lorsque le rapport molaire des substrats est passé de **1/0,5 à 1/1,** l'efficacité de conversion de l'acide oléique est passée de **10%** à **56%.** Une augmentation supplémentaire du rapport molaire **[**supérieur à **1/1 (56%)]** n'a pas eu d'effet positif sur la production d'oléate de saccharose, ce qui peut être dû à l'effet inhibiteur d'une concentration élevée d'acide sur l'activité enzymatique.

L'évolution du rendement de la synthèse enzymatique de sucroesters en fonction de la valeur du rapport molaire sucre/acide gras peut suivre deux types de profils. Avec la lipase de « *Rhizome cornière* », par exemple, une augmentation du degré de conversion du fructose en caprylate ou oléate de fructose est observée lorsque le rapport molaire diminue, c'est-à dire lorsque la proportion d'acides gras dans le milieu augmente **[146].** L'autre profil correspond à la présence d'une valeur optimale de ce paramètre. Ce résultat a été obtenu avec la lipase de « *Candida antartica* » lors de la synthèse d'oléate de méthyl-l-g1ucose (MUTUA ET AKOH,

1993), de palmitate d'ascorbyle (RUMEAU et al. 1995) et d'oléate de fructose (COULON et al., 1996) [**160].**

En effet, plus la quantité d'acide gras est élevée moins la conversion est important. GILLES OLIVE ET GABRIRLA, ont indiqué que le ratio molaire fructose/ acide laurique a une plus grande influence sur la conversion. En effet, plus la quantité d'acide est élevée moins la conversion est importante, allant de 76 % pour un ratio 1/1 à seulement 33,6 % pour un ratio 1/5 en passant par 59,0 % pour un ratio 1/2. **[161]** Dans notre cas, la lipase de ricin est probablement inhibée par le donneur d'acyle ou bien par une limitation de la concentration de saccharose dans le milieu, ce qui concorderait avec les travaux de SOULTANI et al **[86]**

Par conséquent, le rapport molaire **1/1** était maintenu comme optimal pour un rendement de conversion plus élevé d'oléate de saccarose **(56%)**.

IV.4.4 Effet de la température :

Pour étudier l'effet de la température sur la conversion de l'acide oléique, la réaction d'estérification a été réalisée à différentes températures allant de **25 °C à 60 °C** dans un bain marie**.** L'effet de la température sur le rendement d'acylation est montré sur **La figure IV.5.**

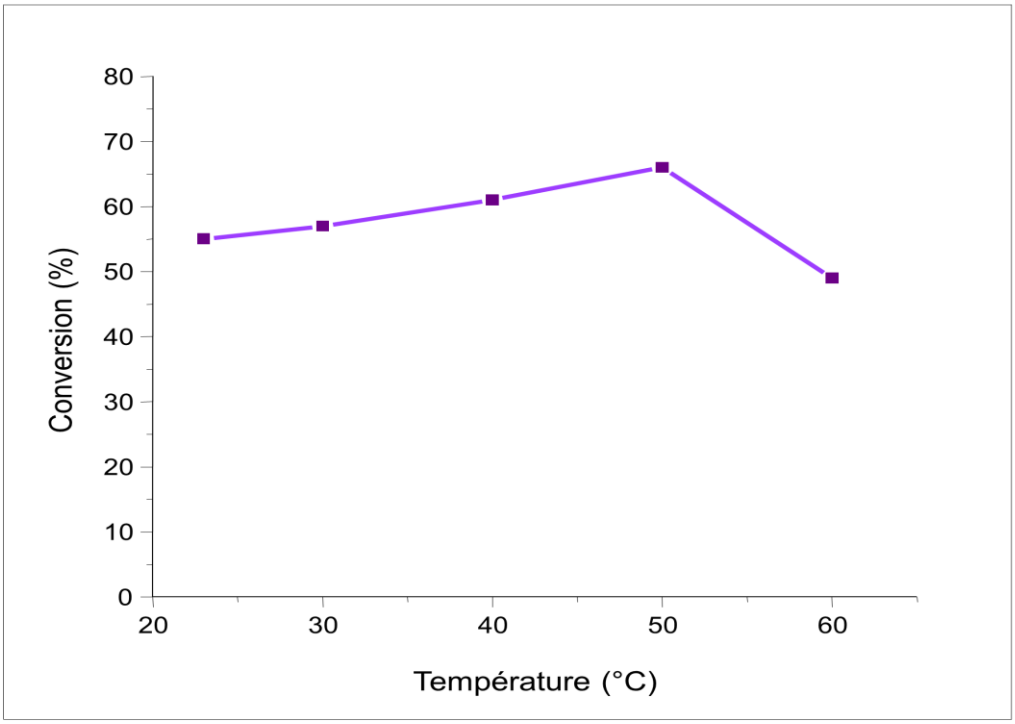


Figure IV.5 : Effet de la température sur la conversion d'acide oléique par la lipase de ricin.

Conditions de réaction : Saccharose = 1 mmol, Acide oléique = 1 mmol, a_w = 0.099, Masse de lipase immobilisée = 0.5g, Agitation = 400 rpm, t = 2h, **T = 25 °C à 60 °C**, Acétone = 5 ml.

⇒ **Discussion des résultats :**

À partir des données présentées dans **La figure IV.5**, nous voyons que le taux de conversion est significativement affecté par la température. La conversion maximale obtenue après 2 h de réaction à **50 °C** était de **66 %.** La température affecte l'activité de l'enzyme, la solubilité des réactifs et l'équilibre de la réaction. Le taux de conversion de l'acide oléique augmente dans la plage de température de **23 à 50°C**. Cette amélioration est due à une augmentation simultanée de l'activité enzymatique et de la solubilité du réactif dans le milieu réactionnel. Cependant, au-dessus de **50°C**, l'enzyme sera partiellement inactivée ou inhibée, ce qui entraînera une conversion réduite de l'acide oléique.

La diffusion du substrat dans l'enzyme affecte l'activité de lipase et elle est favorisée à des températures élevées. Cependant, les températures excessives doivent être évitées en raison de la dénaturation de la lipase.

Pour la synthèse enzymatique des esters de glucose, YU et *al* ont rapporté que lorsque la température de réaction augmentait de 35 °C à 50 °C, l'activité enzymatique augmentait, par conséquent le rendement augmente **[142].**

La même température optimale a également été déterminée pour la lipase immobilisée de « *Mucor oryzae* » lors de la synthèse de l'octanoate et de l'oléate de fructose (GUILLARDEAU et al. 1992 ; KHALED et al. 1992) [**141].**

ARCOS ET COLL. (1998a) ont étudié l'effet de températures comprises entre 5 et 60 °C sur la synthèse sélective du 1,6-diacylfructofuranose en utilisant du « *Novozym 435* » dans de l'acétone. Ces auteurs ont montré que l'augmentation de la température augmente la vitesse initiale et la conversion du fructose. De plus, lorsqu'on augmente la température, on obtient une meilleure sélectivité en mono-esters, sans doute due à la solubilité accrue du fructose dans l'acétone **[138]**

La température joue un rôle crucial dans la synthèse de l'ester de sucre en milieu organique tell que l'augmentation de la température accélère généralement la vitesse de réaction car elle augmente l'énergie cinétique des molécules, permettant aux substrats de se lier plus fréquemment au site actif de l'enzyme. Aussi La température influence également la

viscosité du milieu réactionnel et la solubilité des substrats et produits, paramètres qui affectent la diffusion des molécules vers le site actif de l'enzyme.

Basé sur ces résultats obtenus, la température a été fixée à **50 °C** pour la suite de l'étude

IV.4.5 Activité de l'eau :

La conversion d'acides gras (acide oléique) est fortement influencée par la présence d'eau. Pour avoir l'effet de cet important facteur, cinq expériences ont été réalisées avec l'ajout de différentes proportions d'eau distillée.

A la fin de ces expériences en évalue l'effet de l'activité de l'eau sur le la conversion de l'acide oléique. Les résultats sont présentés dans **La figure IV.6 suivant :**

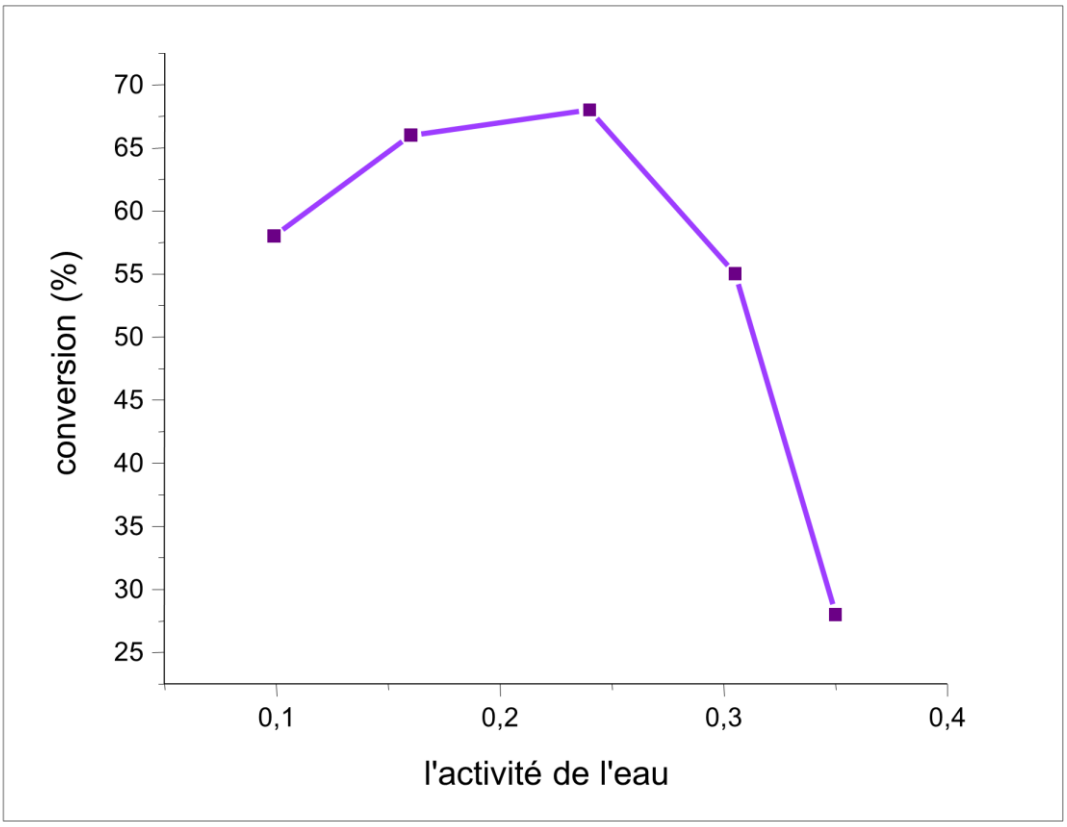


Figure IV.6 : Effet de l'activité initiale de l'eau sur le taux de conversion de l'acide oléique par la lipase de ricin.

Condition de réaction : Saccharose = 1 mmol, Acide oléique = 1 mmol, a_w **= 0,099 à 0,35**, Masse de lipase immobilisée = 0.5g, Agitation = 400 rpm, t = 2h,

T = 50°C, Acétone = 5 ml.

⇒ **Discussion des résultats :**

À partir des données présentées dans **La figure IV.6**, nous constatons que la conversion est significativement affectée par l'activité de l'eau. Après un temps de réaction de 2 h, une conversion maximale de **68 %** a été obtenue dans **0,24** d'activité de l'eau. Ces résultats peuvent s'expliquer par deux effets : l'effet de l'eau sur l'activité enzymatique et l'effet sur l'équilibre thermodynamique de la réaction. En fait, les molécules d'eau participent à de multiples liaisons hydrogène et assurent une mobilité conformationelle à l'enzyme. Une petite quantité d'eau dans le mélange réactionnel est essentielle pour maintenir l'activité enzymatique, tandis qu'une augmentation de la quantité d'eau aura un effet néfaste sur l'équilibre (en augmentant la teneur en eau, l'équilibre de la réaction se déplace vers l'hydrolyse du ester, et donc le rendement d'acylation diminue. De plus, la présence d'eau peut également affecter la progression des réactions enzymatiques en modifiant la solubilité de certains substrats. Par exemple, lors de la réaction de synthèse des esters de saccharose, la présence d'eau au début de la réaction guide la synthèse des esters car elle augmente la solubilité du sucre afin que le potentiel de l'enzyme puisse être utilisé efficacement pour la réaction de synthèse. Le niveau d'eau optimal doit être maintenu tout au long de la réaction **[92].**

Dans les premières études sur la biocatalyse dans les solvants organiques, l'activité catalytique d'une enzyme était liée à la quantité d'eau liée à l'enzyme.

KIM et *al.* (2000) ont réalisant l'estérification par voie enzymatique d'acides gras avec l'aglycéro phosphatidyl choline en milieu fondu et ont déterminé une relation entre l'activité de l'eau du Lipozyme lM de Mucor miehei et la quantité de DMF utilisé comme co-solvant organique dans le milieu de synthèse. Ces auteurs ont montré que d'une part, de faibles a_w ne permettent pas à l'enzyme d'avoir une bonne conformation pour la réalisation de la synthèse. D'autre part, un excès d'eau déplace l'équilibre thermodynamique dans le sens inverse de la synthèse (hydrolyse). Des conditions optimales de fonctionnement de cette enzyme ont été déterminées. Ces conditions consistent à travailler avec 5 à 10% (v/p) de DMF et de maintenir a_w du biocatalyseur à des valeurs de l'ordre de 0.3 à 0.6 **[162].**

THANONGSAK et *al,* ont trouvés le rendement maximal en ester formé à partir de glucose et de PFAD (94,1% d'acide palmitique) par la lipase « *Antarctica C* », avec une activité de l'eau de 0,07 dans l'acétone **[163].**

L'eau joue un rôle très important dans la synthèse de l'ester de sucre en milieu organique. Si d'une part une accumulation d'eau produite par la réaction force l'équilibre réactionnel vers l'hydrolyse, au lieu de vers la synthèse d'esters, une certaine quantité d'eau est indispensable à l'hydratation et à la stabilisation des trois- structure dimensionnelle des lipases, en particulier en présence de solvants organiques, en particulier les solvants polaires, qui peuvent pénétrer dans le site actif des enzymes provoquant le déploiement des protéines en raison de perturbations de ces forces. Par ailleurs, la teneur en eau influence également la productivité car sa présence dans le milieu réactionnel augmente significativement la solubilité du sucre dans le mélange réactionnel.

Basé sur ces résultats obtenus, l'activité initiale de l'eau a été fixée à **0.24 d'eau** pour la suite de l'étude.

IV.4.6 Effet du temps de réaction :

Le temps de réaction ou temps de contact est l'un des paramètres qui influencent le rendement de la réaction et le déplacement de l'équilibre. Par conséquent, la synthèse de l'oléate de saccharose catalysée par la lipase a été surveillée au fil du temps. Pour cela nous avons mesuré le taux de conversion de l'acide oléique à différents intervalles de temps.

L'effet de temps sur la conversion de l'acide oléique est montré dans **La figure IV.7** suivant **:**

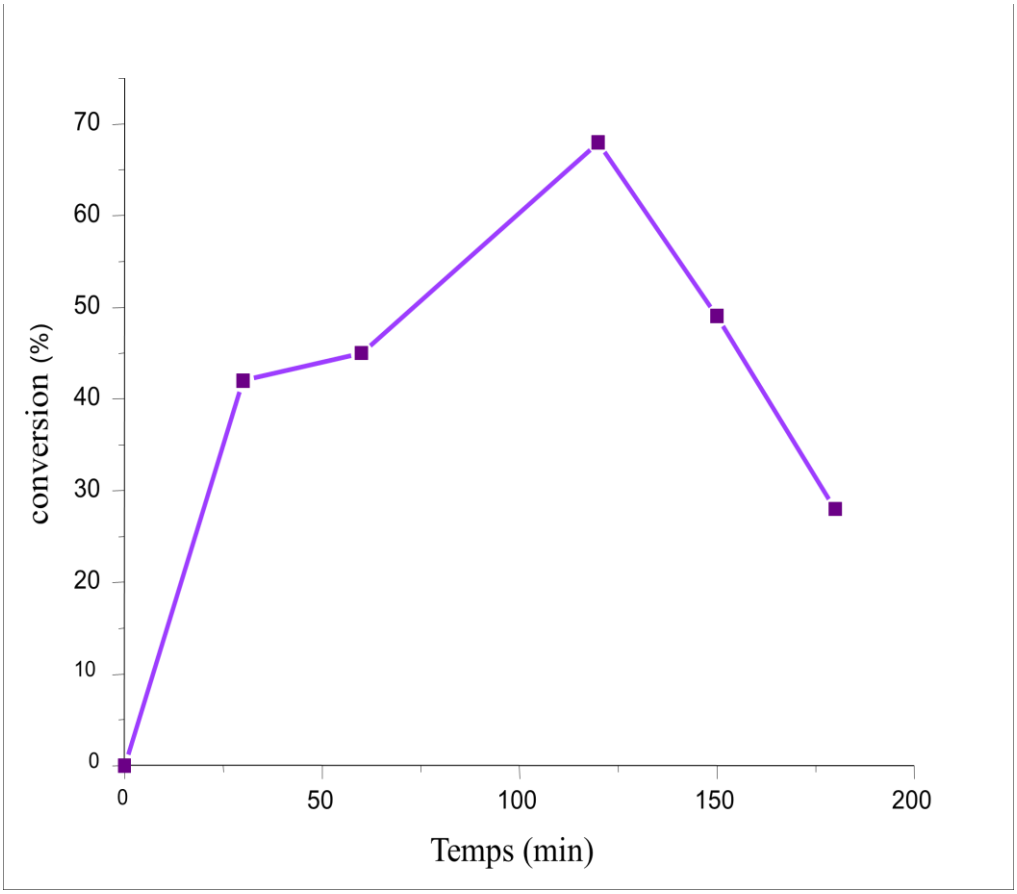


Figure IV.7 : Effet du temps sur la conversion d'acide oléique par la lipase de ricin.

Conditions de réaction : Saccharose = 1 mmol, Acide oléique= 1 mmol, a_w = 0.24, Masse de lipase immobilisée = 0.5g, Agitation = 400 rpm, **t = 30 min à 3h**, T = 50°C, Acétone = 5 ml.

⇒ **Discussion des résultats :**

Les résultats sont illustrés sur **La figure IV.7**. La conversion de l'acide oléique augmente avec le temps de contact. La conversion maximale a lieu durant **les deux premières heures**. Après 2 heures, la vitesse de réaction diminue rapidement. L'équilibre est atteint. La vitesse de la réaction d'estérification devient égale à celle de la réaction inverse, l'hydrolyse. La conversion maximale en acide oléique est d'environ de **68%.**

Pour qu'un processus enzymatique soit efficace, il est souhaité d'avoir un temps de réaction court et une conversion élevée. Une interaction optimale entre le substrat et l'enzyme est nécessaire pour avoir un bon taux de conversion. Cependant, après un certain intervalle de temps, aucune augmentation n'est généralement observée dans la conversion du substrat en

produit en raison soit de l'effet d'inhibition du produit, soit de la formation d'un sous-produit susceptible d'inverser la réaction et de conduire à l'hydrolyse du produit formé.

ABDULMALEK et *al,* ont fait une étude de réaction pendant 72 h. Cependant, dans leurs travaux, la cinétique de la réaction n'a été suivie que pendant les 4 premières heures, car la conversion maximale a été atteinte plus rapidement. Cela suggère que l'équilibre a été atteint en 2 heures avec le rendement le plus élevé avec une conversion de 77 %. Après 2 heures, aucune augmentation significative de la conversion n'a été observée **[164].** Sur la base de leurs résultats, le temps de réaction pour obtenir une conversion élevée peut être considéré comme court puisque la synthèse des esters de sucre nécessite généralement une longue période d'incubation pour atteindre un rendement maximal **[125].** Le temps de réaction court a été favorisé par la solubilité complète du sucre.

Le temps de réaction est un paramètre important à optimiser pour la synthèse enzymatique des sucroesters. Des temps de réaction relativement courts sont généralement favorables pour cette réaction. Cependant, le temps de réaction doit être suffisamment long pour permettre une conversion élevée des substrats en produits. De plus, le temps de réaction doit être contrôlé pour éviter l'inhibition de l'enzyme par les sucroestérs produits. Des temps de réaction trop longs peuvent aussi avoir des effets néfastes, comme la dégradation des sucres ou la formation de sous-produits indésirables. Il est donc important de trouver un compromis entre le temps de réaction et le rendement souhaité.

Le rendement maximal en oléate de saccharose **(68%)** a été obtenu après **2h** de temps de réaction.

Tableau IV.2 : Résumé des résultats de la synthèse de l'oléate de saccharose .

Les différents effets et choix	La valeur optimale	Les rendements (%)
Choix de sucre	Saccharose	64%
Effet de rapport molaire	1/1	56%
Effet de température (°C)	50°C	66%
Activité de l'eau (aw)	0,24	68%
Effet de temps(h)	2h	68%

PARTIE « C » :

Caractérisation

De L'oléate de saccharose.

V. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES :

V.1 Caractérisation structurale de l'ester de saccharose :

La caractérisation structurale de l'ester de saccharose implique l'analyse de sa composition moléculaire et de ses propriétés physico-chimiques. Les esters de saccharose sont des composés amphiphiles qui possèdent à la fois une partie hydrophile et une partie hydrophobe, ce qui leur confère des propriétés tensioactives. Ils sont généralement obtenus par estérification du saccharose avec des acides gras. La caractérisation structurale de l'ester de saccharose implique donc l'identification du nombre d'acides gras liés au saccharose, la longueur de la chaîne carbonée des acides gras, et la distribution des esters mono, di, et tri-esters dans le mélange. Cette caractérisation est essentielle pour comprendre les propriétés physico-chimiques.

L'analyse des groupes chimiques de l'oléate de saccharose a été effectuée par l'utilisation de l'analyse par spectrométrie infrarouge avec transformée de Fourier. C'est une technique analytique très efficace pour identifier rapidement les "familles chimiques" des substances. Elle mesure l'absorption de la lumière infrarouge par un échantillon et génère un spectre basé sur les groupes fonctionnels présents dans le matériau dans la région "empreinte digitale" du spectre FTIR (600-1400 cm-1).

V.2 Caractérisation fonctionnelle de l'ester de saccharose :

Les propriétés physiques et l'activité de surface du produit sont déterminées par la tension superficielle, la valeur HLB, la solubilité, l'indice d'émulsification (E24) et le pouvoir moussant.

V.2.1 Détermination de la tension superficielle et la CMC :

La tension superficielle c'est une propriété physique des liquides qui se manifeste par une force qui tend à réduire la surface libre du liquide pour minimiser son énergie. Elle est mesurée en unités de force par unité de longueur, comme les dynes par centimètre (dyne/cm) ou les newtons par mètre (N/m).

La mesure de la tension de surface (ou tension superficielle) permet de déterminer une caractéristique importante des tensioactifs : c'est la Concentration Micellaire Critique (CMC).

Cette concentration est, par définition, la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles **[61].**

a. Méthode de mesure la tension superficielle et CMC :

- On dissout 0.1g de l'oléate de saccharose dans 1L de l'eau distillée,
- La solution est diluée 10 fois, à chaque fois, on prenant volume de 50 ml de solution d'oléate de saccharose et on le met dans une fiole de 100 ml, puis on ajoute l'eau distillée jusqu'à le trait,
- De chaque fiole, nous prélevons un échantillon de 50 ml et le mettons dans un tube à essai pour effectuer le test de la tension superficielle à température ambiante,
- La CMC est mesurée sur la base du point de rupture de la tension superficielle par rapport à la concentration du produit.



Figure V.1 : Les tubes de solution tensioactive diluée.

Les mesures de tensions superficielles sont faites à l'aide d'un Tensiomètre de Nouy ou à anneau. Une lame de platine est placée tout près de la surface de la solution. La lame est alors attirée par le liquide et la force nécessaire pour la ramener à sa position initiale correspond à la tension superficielle exprimée en (dyne/cm) **[61].**



Figure V.2: Tensiomètre: KRÜSS Gmbh (Germany)

Les résultats des mesures sont présentés dans **La figure V.3** suivant :

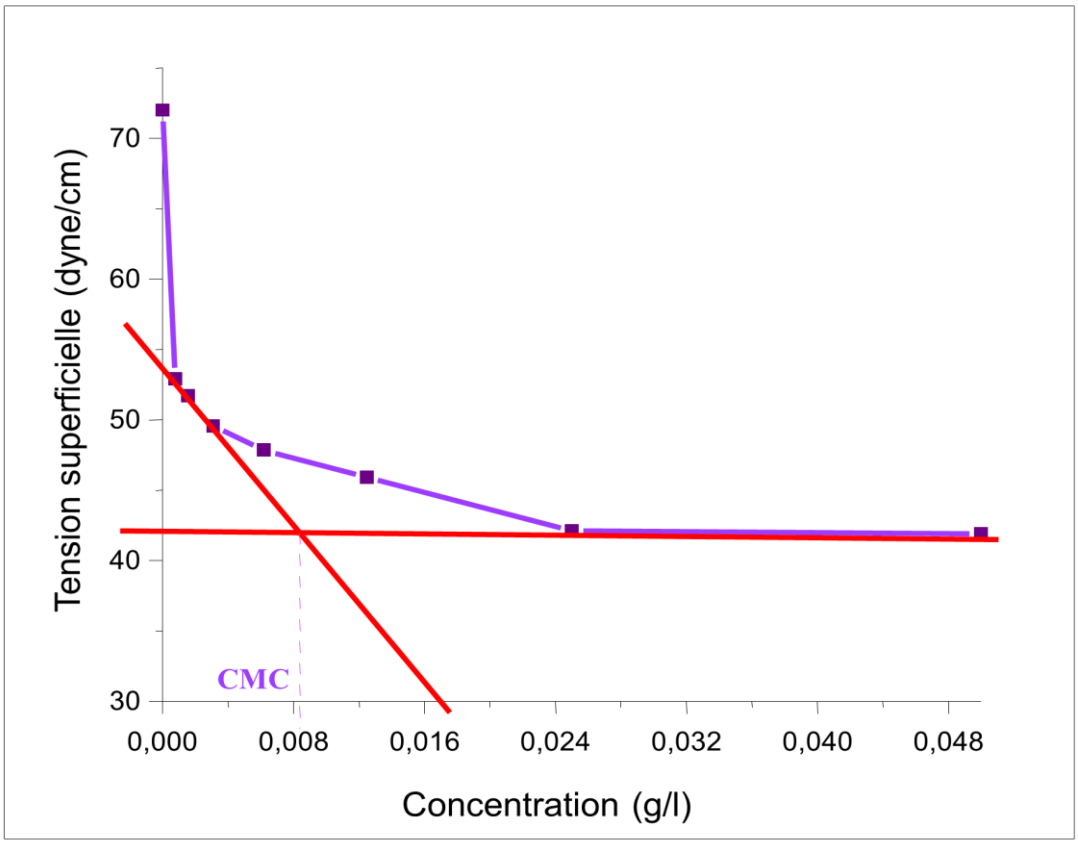


Figure V.3 : Variation de la tension superficielle du l'oléate de saccharose en fonction de la concentration à température ambiante.

b. Discussion des résultats :

Les mesures ont été effectuées sur des solutions aqueuses d'oléates de saccharose. Ces mesures vont permettre de tracer l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration du tensioactif. La rupture de pente de la courbe donne la valeur de la CMC **[61].**

Les tensioactifs ont pour rôle de réduire la tension de surface d'un liquide. La tension de surface de l'eau distillée est de l'ordre de **72 dyne/cm**, Les molécules ayant des propriétés tensioactives peuvent réduire cette valeur dans un intervalle généralement compris entre 30 et 50 dyne/cm [**65]**

Les tensions superficielles obtenues indiquent que l'oléate de saccharose réduit la tension superficielle de l'eau de **72 à 41.9 dyne/cm** pour une concentration **0.1g/1L** à température ambiante. A partir d'une certaine concentration, le changement de la tension superficielle est négligeable, Lorsque cette concentration est atteinte, la surface de l'eau est saturée en oléate de saccharose. Cette concentration correspond au point où l'oléate de saccharose présente la plus faible de tension superficielle. C'est une valeur stable et constante, caractéristique d'un tensioactif donné sous température ambiant, appelée CMC (Concentration micellaire critique). Par conséquent, à partir de la courbe présentée dans **La figure V.3,** la CMC de l'oléate de saccharose est de **0.0081 g/ L**.

OSIPOW, et *al*, montre que la valeur de la tension superficielle en présence de l'oléate de saccharose à température ambiante, varie entre 31,8 dyne /cm [C= 1%] et 32.7 dyne /cm [C= 0,05%] **[167].**

PYO et *al,* indiquent que la tension superficielle des sucroesters varie entre 25 et 40 mN/m pour des concentrations entre 0,05 et 0,20 g/l **[166].**

MITSUBISHI chemical corporation, une compagnie japonaise spécialisée dans la synthèse des sucroesters donne une valeur de la tension superficielle de l'ordre de 34.5 dyne/cm pour une solution contenant 0.1% d'oléate de saccharose **[165].**

Les différences constatées sont probablement dues au degré de pureté de l'oléate de saccharose ou bien à la présence simultanée de mono- et de di-esters.

SOULTANI et al montre que les valeurs la plus fiables de CMC (5,6mg/l) et de tension de surface (36Mn/m) sont obtenus avec le palmitate de saccharose **[86].**

YE, Ran, HAYES et *al*, indique que l'oléate de saccharose à donner une tension de surface l'égerment plus élevée (29.6 Mn/m) et une CMC plus élève, cette dernière tendance reflétant la pureté et la polarité de l'oléate de saccharose **[168].**

L'oléate de saccharose présente donc une bonne propriété tensioactive.

V.2.2 Détermination de la HLB (Balance Hydrophile- Hydrophobe) :

La HLB est un nombre qui caractérise la solubilité préférentielle des molécules tensioactives dans l'eau ou dans l'huile**.** La mesure du HLB peut être effectuée par diverses méthodes. La HLB est une valeur empirique qui définit le caractère lipophile ou hydrophile d'un tensioactif et en déduit ainsi des propriétés fonctionnelles **[86]**.

Pour les esters d'acides gras, la valeur HLB peut être calculée par l'équation comme suit **[114] :**

$$HLB = \left(1 - \frac{Is}{Ia}\right) * 20 \quad \text{..... (Eq. 1)}$$

Avec :

Is : indice de saponification de l'ester,

Ia : indice d'acide de l'acide gras. (**Voir l'annex A.1.)**

⇒ **Discussion des résultats :**

La HLB est une caractéristique des tensioactifs qui est étroitement liée à la structure des molécules, La détermination de ce paramètre permet de prédire l'action d'un tensioactif donné en solution, les tension actifs ayant une HLB inférieur à 10 sont lipophiles et stabilisent les émulsions eau dans huile E/H, tandis que pour des HLB supérieur à 10 les agents de surface présentent un caractère plus hydrophile et stabilisent les émulsion huile dans eau H/E **[61].**

D'après l'équation **(Eq. 1) :**

$$HLB = \left(1 - \frac{Is}{Ia}\right) * 20 = 13.24$$

la HLB de l'oléate de saccharose égale à **13.24**, Cette résultats montrent que l'oléate de saccharose est un émulsifiant de type **huile dans l'eau (H/E)**. On a étudié uniquement l'effet de l'oléate de saccharose sur la stabilité d'émulsion huile dans eau

(H/E). Après on a déterminé l'indice d'émulsification de l'émulsion huile d'olive dans l'eau à la présence de l'oléate de saccharose.

SOULTANI S. et *al* ont obtenu pour les esters de fructose des valeurs de HLB comprises entre 6,3 et 10,8 [**86].**

MITSUBISHI CHEMICAL COPORATION, une compagnie japonaise spécialisée dans la synthèse des sucroesters, donner une valeur de HLB de l'oléate de saccharose égale 15 **[165].**

YE, RAN, HAYES, et *al*, mentionnés une valeur de HLB de l'oléate de saccharose égale à 10.1 **[168].**

V.2.3 La solubilité :

La solubilité est une propriété physique caractéristique. Il s'agit de la quantité maximale de soluté qui peut être dissoute dans un volume donné de solvant [**169].**

a. Mode opératoire :

Pour déterminer la solubilité de l'oléate de saccharose, nous avons dissous 0,02g de l'émulsifiant de l'oléate de saccharose dans 250 ml de l'eau distillée et dans déférentes solvants organiques : méthanol, éthanol, toluène, butanol, à l'aide d'une agitation manuelle pendant 10 minutes.

b. Discussion des résultats :

Les essais ont été effectués dans le méthanol, éthanol, toluène, butanol et l'eau distillée. Sont présentés dans la figure ci-dessus :



Figure V.4 : La dissolution de l'oléate de saccharose dans de différents solvants.

Les résultats de comportement de l'oléate de saccharose dans les déférents solvants sont présents dans le tableau suivant :

Tableau V.1 : Solubilité de l'oléate de saccharose dans différents solvants à 25°C.

Solvant	Eau distillée	Ethanol	Toluène	Butanol	Méthanol
Solubilité de l'oléate de saccharose	peu soluble	Soluble	soluble	Peu soluble	Soluble

D'après les résultats motionner dans le tableau, on peut dire que l'oléate de saccharose est soluble dans l'éthanol, le toluène et le méthanol. Par contre, il est semi soluble dans l'eau distillée et dans le butanol.

OSIPOW, LLOYD et *al*, retrouve que les esters de saccharose semblent être solubles dans l'eau chaude. Il a été déduit que plus la valeur HLB est élevée, plus la solubilité dans l'eau est élevée **[167].**

MITSUBISHI chemical corporation, une compagnie japonaise spécialisée dans la synthèse des sucroesters indique que l'oléate de saccharose se dissout dans l'eau et dans l'éthanol à différentes températures (25 °C et 75°C) **[165].**

PYO, SANG-HYUN et *al*, indique que les sucroesters possèdent longue chaine d'acyle (>C_{14}) sont faiblement soluble dans l'eau [**166].**

En résumé, la solubilité modulable des sucroesters en fait des émulsifiants très polyvalents dans l'industrie alimentaire, permettant de stabiliser une grande variété de produits.

V.2.4 Détermination de l'indice d'émulsification (E24) :

Le pouvoir émulsifiant traduit la capacité des agents de surface à disperser et à maintenir en suspension un liquide dans un autre liquide non miscible constituant l'émulsion, la fonction d'un agent émulsifiant est donc de stabiliser cette dispersion obtenue par

homogénéisation. L'agitation du système permettant d'apporter l'énergie nécessaire à la création d'une aire interfaciale. La stabilité des émulsions obtenues est possible grâce à la réduction des tensions superficielle et interfaciale par le tensioactif [**86].**

La préparation et la stabilisation d'une émulsion nécessite la présence d'un tensioactif afin de :

- réduire la tension interfaciale entre les deux phases.
- permettre la dispersion (augmentation de l'aire de l'interface).

Une émulsion est constituée d'une suspension de fines gouttelettes d'une phase liquide dans un liquide non miscible **[61]**

a. Mode opératoire :

Le pouvoir émulsifiant d'un tensioactif est déterminé en mesurent au cours du temps la stabilité de l'émulsion formée entre deux liquides non miscible ici l'eau (phase hydrophile) et l'huile d'olive (phase hydrophobe). En présence d'un émulsifiant (oléate de saccharose),

Une émulsion entre 2 phases non miscibles a été préparée selon le mode opératoire suivant :

- mélanger 9 ml de solution d'oléate de saccharose (0,01%) et 1 ml d'huile d'olive dans un bécher,
- La formation de l'émulsion est assurée par homogénéisation durant 5 minutes,
- Le mélange est laissé au repos à température ambiante pendant 24 h,
- Après 24 h, on mesure l'indice d'emulsification E24, définit comme le pourcentage de la hauteur de la phase émulsionnée formée, divisée par la hauteur totale du mélange après 24 h. Comme montré par l'équation **(Eq.2)** suivante :

$$\boldsymbol{E24} = 100 \times \frac{He}{Ht} \quad \text{..... (Eq.2)}$$

Avec :

Ht : hauteur totale de mélange (cm).

He : hauteur de l'émulsion formée (cm).

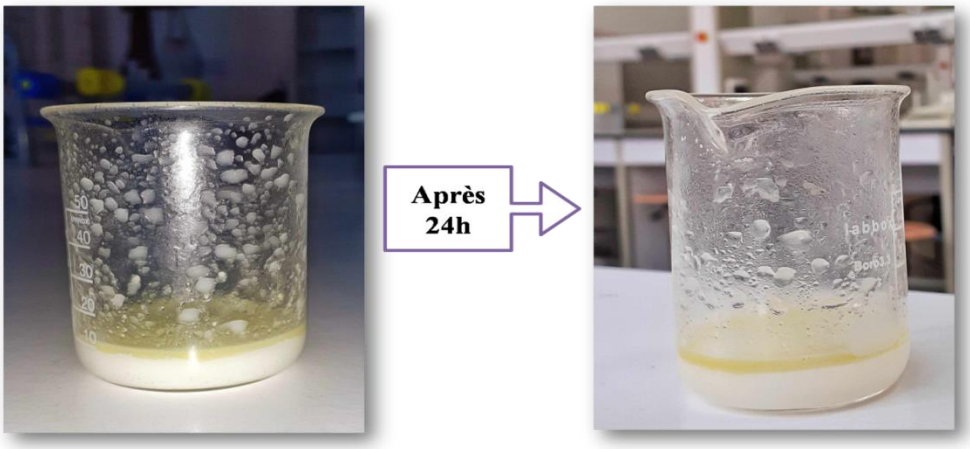


Figure V.5 : émulsion de l'huile d'olive dans l'eau**.**

b. Discussion des résultats :

La valeur HLB de l'oléate de saccharose est une bonne indication pour son utilisation potentielle pour la préparation des émulsions huile dans l'eau (H/E).

D'après l'équation :

$$E24 = 100 \times \frac{HE}{HT} = \frac{0.7}{1} = 70\%$$

Plus l'indice E24 est élevé, plus l'émulsion est stable, plus les deux liquides ont du mal à se séparer, donc dans ce cas la valeur obtenue d'E24 est signifié que **70%** du mélange est constitué par la phase dispersée (en général, l'huile) après 24 heures de repos. Autrement dit, 30% de la phase dispersée s'est séparée de la phase continue (en général, l'eau) pendant cette période.

Sur le plan opérationnel, une émulsion stable est une émulsion qui met très longtemps à subir les différents processus qui aboutissent à la séparation des phases huileuse et aqueuse.

La stabilité des émulsions H/E et E/H est illustrée dans les études de (MOHAMED G. MEGAHED, 1999) qui montre que le lauréate et le palmitate de saccharose ont une stabilité d'émulsion H/E élevée après 12 heures. L'oléate de saccharose, quant à lui, présente une faible stabilité de l'émulsion H/E (peut-être à cause de sa faible pureté) après la même période [**105].**

Les premiers travaux étaient concerné particulièrement les mono- et di-esters à courte chaîne carbonée synthétisés par voie chimique (OSIPOW et al. 1956) **[167].** Par la suite, (HILL et al. 1987) ont étudié la stabilité des émulsions préparées avec des esters de lactitol et

d'acide gras en C_{16} et C_{18} non purifiés. Ces auteurs ont montré que le lactitol palmitate permet d'aboutir à des émulsions Huile de soja/Eau plus stables que le lactitol stéarate [**170].**

La plupart des études ont été menées sur des esters de saccharose à courtes chaînes, et plus particulièrement sur les mono- et di-esters (OSIPOW et al. 1956) **[167].** Ces sucroesters possèdent une importante activité de surface. Ils permettent de réduire considérablement la tension superficielle, ce qui favorise la formation et la stabilisation des émulsions (HILL et al. 1987) **[170].**

V.2.5 Pouvoir moussant :

Les mousses sont des dispersions des bulles de gaz dans une phase continue liquide ou semi-solide qui contient un tensioactif. Elles peuvent être produites par fouettement d'une solution aqueuse de tensioactif en présence d'une grande masse gazeuse. Le fouettement apporte l'énergie nécessaire à la création de l'interface gaz-liquide. Le pouvoir moussant d'un tensioactif doit prendre en compte deux critères : la quantité de mousse formée et sa stabilité dans le temps [**61].**

a. Mode opératoire :

Le pouvoir moussant de la solution aqueuse d'oléate de saccharose **(0,01 g de saccharose + 100 ml d'eau distillée) (0.01%)** a été déterminé comme suit :

- Nous prenons 50 ml de la solution qu'on agite pendant 5 minutes à l'aide d'un homogénéisateur.
- Les hauteurs de mousse ont été mesurées à la fin de l'opération et après 5 minutes.

b. Discussion des résultats :

L'oléate de saccharose présente un faible pouvoir moussant, tant du point de vue quantité que stabilité de la mousse formée. D'après l'image ci-dessous, on a vu qu'une petite quantité de mousse était formée, mais en quelques instants elle avait disparu. Elle est donc instable, et alors la hauteur n'a pu être mesurée.

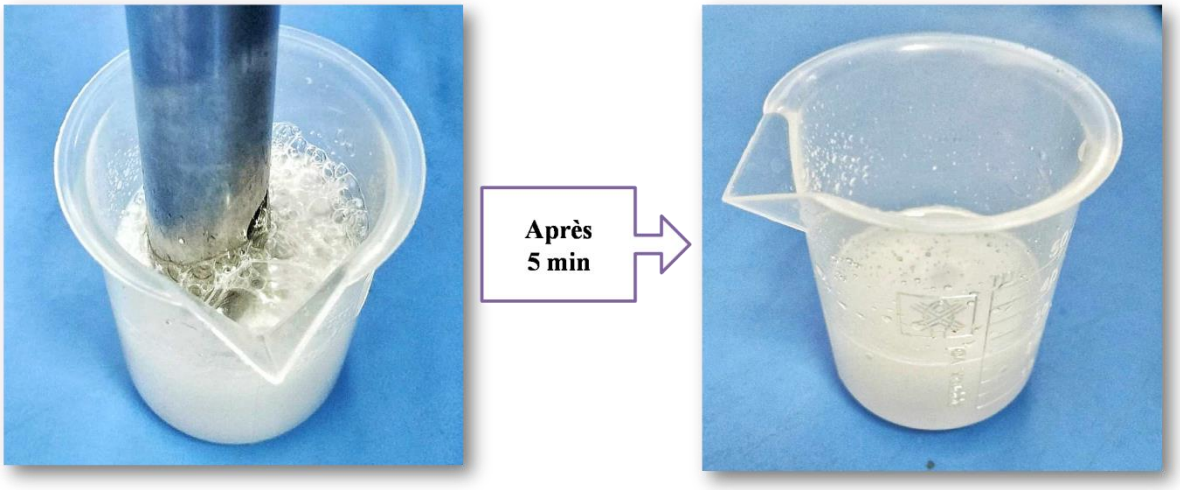


Figure V.6 : pouvoir moussant de l'oléate de saccharose.

On a également expliqué le faible pouvoir moussant des sucroesters par leur hydrophobicité élevée due à la présence d'une chaine hydrophobe attachée à la molécule de saccharose. Cette hydrophobicité réduit la capacité à réduire la tension superficielle de l'eau, ce qui affecté leur pouvoir moussant .En effet, les particules hydrophobes sont généralement utilisées comme des agents anti-mousses.

A partir la figure ci-dessous le HLB de l'oléate de saccharose (**13.24**) ne présentes pas de propriétés moussants.

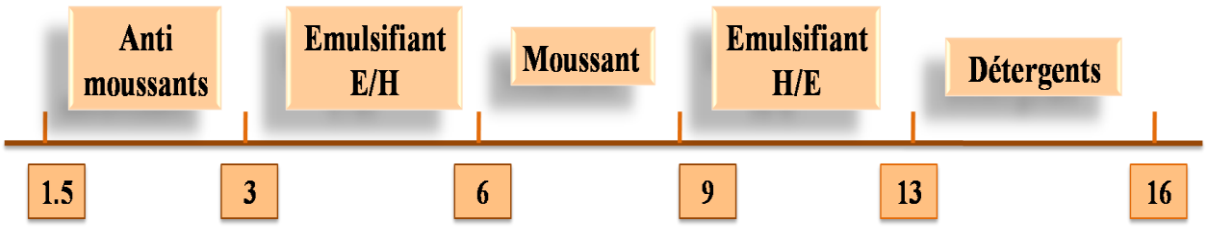


Figure V.7 : propriétés fonctionnelles des tensioactifs en fonction de la valeur HLB

Les pouvoirs moussants de mono- et di-lauréats de saccharose ont été étudiés et comparés à ceux de sucroesters du commerce par HUSBAND et al. (1998). Ces auteurs ont

reporté que les mono-lauréats de saccharose présentent un meilleur pouvoir moussant, tant du point de vue quantité que stabilité de la mousse formée, comparés aux di-lauréats de saccharose. Cependant, les solutions aqueuses préparées avec des mélanges de mono- et di-esters, ont présenté un meilleur pouvoir moussant que lorsqu'on utilise les mono- ou di-esters seuls **[171].**

MITSUBISHI chemical corporation, une compagnie japonaise spécialisée dans la synthèse des sucroesters, indique que la mousse obtenu à la présence de l'oléate de saccharose a une hauteur de 14 mm pendant 1 min, et après 5 min la hauteur de la mousse diminue à 12 mm pour une concentration 0.25% de l'oléate de saccharose dissout dans l'eau distillée **[165].**

SOULTANI et *al* observent que les esters de fructose à courte (C_{10}) et moyenne (C_{14}) chaine carbonée présentent de meilleures propriétés moussants comparés aux esters de fructose à longue chaine carbonée (C_{18}) **[86].**

V.2.6 Etude de stabilité structurale et fonctionnelle :

L'objectif est d'étudier la stabilité des émulsions formées par l'oléate de saccharose sous différentes conditions environnementales [pH, température, quantité de NaCl]. L'étude de stabilité est considérée comme indispensable pour garantir la qualité de notre produit sucroester (oléate de saccharose) en vue d'application dans différents secteurs.

a. Mode opératoire pour la stabilité structurale :

- Préparer une solution mère de l'émulsifiant (1g/L) dans de l'eau distillée,
- Mettre 5 ml dans un tube à essai,
- Incuber à une température T donnée (ambiant, 40, 60, 80, 100 °C) pendant 2h,
- Enlevez le tube, laissé refroidir à température ambiante,
  - ➢ Effectuez le test E24 :
- Ajoutez au tube 5 ml d'huile d'olive et vortexer pendant 2 min,
- Laisser reposer 1 min,
- Mesurer la hauteur de l'émulsion par rapport à la hauteur totale,
- Refaire la mesure après 24 h.

➢ **Test Témoin :** Pour chaque température on réalise un test témoin à réaliser (sans émulsifiant).

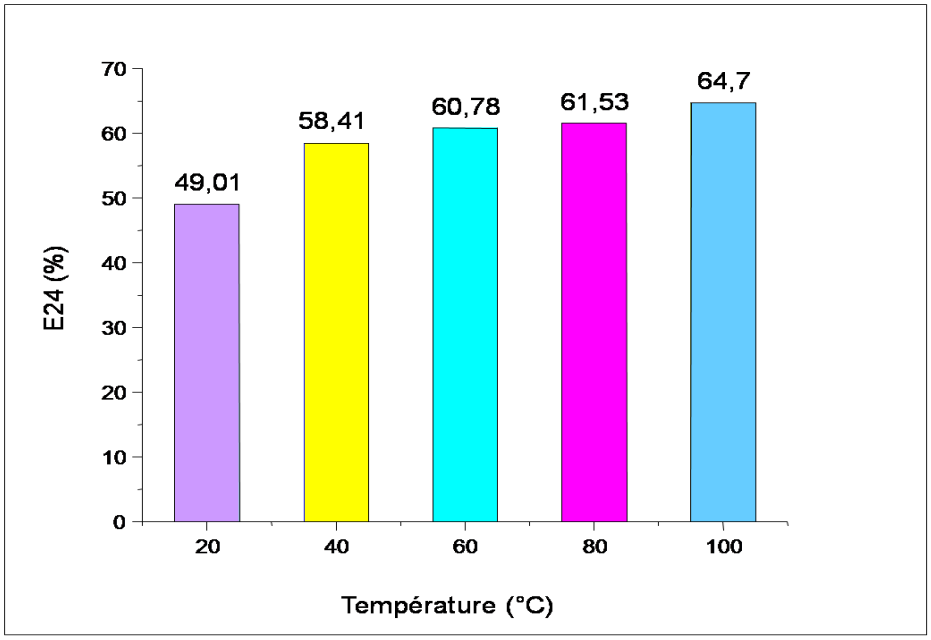


Figure V.8 : Effet de traitement thermique sur le pouvoir émulsifiant de l'oléate de saccharose.

V.2.6.1 Discussion des résultats :



Figure V.9 : les tubes d'émulsine de la solution de l'oléate de saccharose.

L'oléate de saccharose synthétisé par la lipase de « *Ricinus communis* » est avéré thermostable. Le chauffage des solutions de l'oléate de saccharose de concentration de **0.1g/1L** jusqu'à 100°C n'a pas eu un effet significatif sur l'indice d'émulsification **(à 100°C le E24 = 64.7%).** Donc ils restent stables dans la large gamme de températures (20-100 °C).

L'oléate de saccharose est stable jusqu'à des températures de 120-130°C sans se décomposer significativement. Cela permet de maintenir l'intégrité de l'émulsion lors de traitements thermiques. Ces molécules améliorent la dispersion des matières grasses dans les émulsions, évitant ainsi la séparation de phase. Elles stabilisent donc la structure de l'émulsion.

L'oléate de saccharose abaisse la tension interfaciale entre les phases huileuse et aqueuse, facilitant la formation et la stabilisation des gouttelettes de l'émulsion [**172].**

La compagnie de Sisterna qu'est intéressant à la synthèse des sucroesters montre que, les esters de saccharose fondent à des températures comprises entre 45 °C et 65°C, selon le degré d'estérification et le types d'acides gras. Le chauffage à des températures allant à 160°C peut Être effectué sans aucun effet néfaste sur les performances **[106].**

PYO, SANG-HYUN et *al*, dit que sucroesters sont stable dans de températures inférieures à 140°C **[166].**

V.2.7 Mode opératoire pour la stabilité fonctionnelle :

1. Effet de Température :

a. Mode opératoire:

- Préparer une solution mère d'oléate de saccharose 1g/L dans de l'eau distillée,
- Mettre 5 ml de solution préparé dans un tube à essai,
- Ajouter 5 ml d'huile,
- Vortexer pendant 2 à 5 min. Mesurer la hauteur de l'émulsion par rapport à la hauteur totale
- Incuber à 30°C, 40°C pendant 1 semaine en mesurant la hauteur de l'émulsion toutes les 24 h.

➢ **Test Témoin :** Pour chaque température vous avez un seul test témoin à réaliser (sans émulsifiant)

b. Discussion des résultats :

Tableau V.2 : Effet de température (30 °C, 40 °C) sur la stabilité des émulsions en présences de l'oléate de saccharose pendant 48 h.

Températures	La période	E24 de l'émulsion
30°C	24h	53,12
	48h	49
40°C	24 h	57,44
	48h	52,6

D'après **Le tableau V.2** , le temps à un effet néfaste sur la stabilité de l'émulsion de solution de l'oléate de saccharose à des températures différentes (30°C, 40°C°) il est réduit l'indice de l'émulsification de 57.44 à 52.6 (40°C) et de 53.12 à 49 (30°C) pendant 48h après cette période n'a aucun stabilité (séparation des phases).

ALLOUE, Wazé, indique que une élévation de la température peut entrainer des modifications granulométriques et des collisions accrues entre les gouttelettes, ce qui peut affecter la stabilité physique de l'émulsion de l'oléate de saccharose **[2].**

2. Effet de salinité :

a. Mode opératoire :

- Préparer une solution mère d'oléate de saccharose 1g/L dans de l'eau distillée,
- Mettre 5 ml dans un tube à essai,
- Ajouter une masse de NaCl calculée de façon à obtenir différentes concentrations dans les différents tubes (0.1, 0.2, 0.4, 0.5g dans 5ml.),
- Ajouter 5 ml d'huile,
- Vortexer pendant 2 min. Mesurer les hauteurs,
- Incuber à T ambiante pendant 24h,
- Mesurer les hauteurs,
- Calculez l'E24.

➢ **Test Témoin :** Pour chaque concentration vous avez un seul test témoin à réaliser (sans émulsifiant).

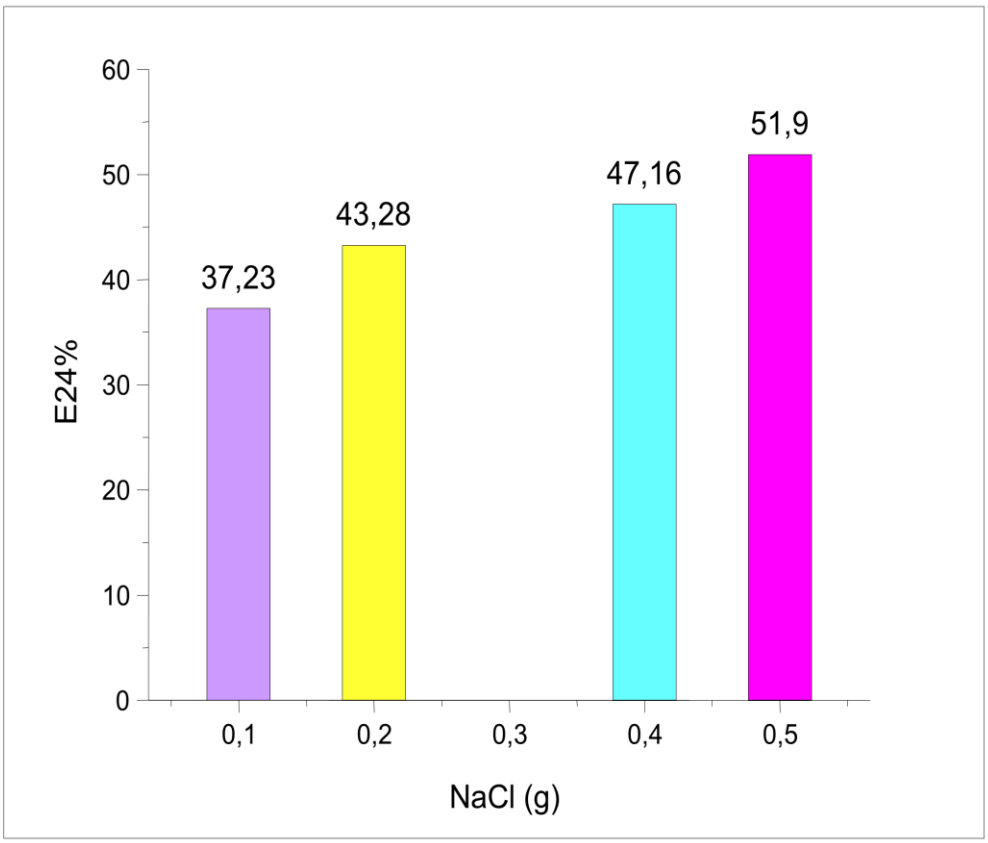


Figure V.10 : Effet de différentes masses de NaCl sur l'émulsion pendant 24 h.

b. Discussion des résultats :

Le chlorure de sodium est capable d'augmenter l'indice d'émulsification de la solution de l'oléate de saccharose de concentration 1 g/L. à partir d'une concentration de 0,1g de NaCl qui dissout dans 5 ml de solution de l'oléate de saccharose. Toutefois, l'augmentation de cette concentration peut améliorer la stabilité de l'émulsion c.à.d. l'augmentation de E24 (**de 37.23 à 51.9 %)**.

L'ajoute de NaCl joue un rôle significatif sur la stabilité des émulsions. il réduit la tension interfaciale, cette réduction contribue à améliorer la stabilité des émulsions en facilitant l'adsorption des molécules de l'oléate de saccharose aux interfaces, ce qu'est réduisent la séparation des phases.

L'addition de l'électrolyte (NaCl) diminue la solubilité des agents tensioactifs (effets de sel) Pour effet d'augmenter l'adsorption aux interfaces **[173].**

3. Effet de pH :

a. Mode opératoire :

- Préparer des solutions de l'émulsifiant (1g/L) dans différents tampons (2, 4, 7, 9, 12),
- Mettre 5 ml dans un tube,
- Ajoutez 5 ml d'huile d'olive,
- Vortexer pendant 2 min,
- Mesurer les hauteurs après 1 min,
- Incuber à T ambiante,
- Mesurer les hauteurs après 24h,
- Calculez l'E24.

➢ **Test Témoin :** Pour chaque pH vous avez un seul test témoin à réaliser (sans émulsifiant).

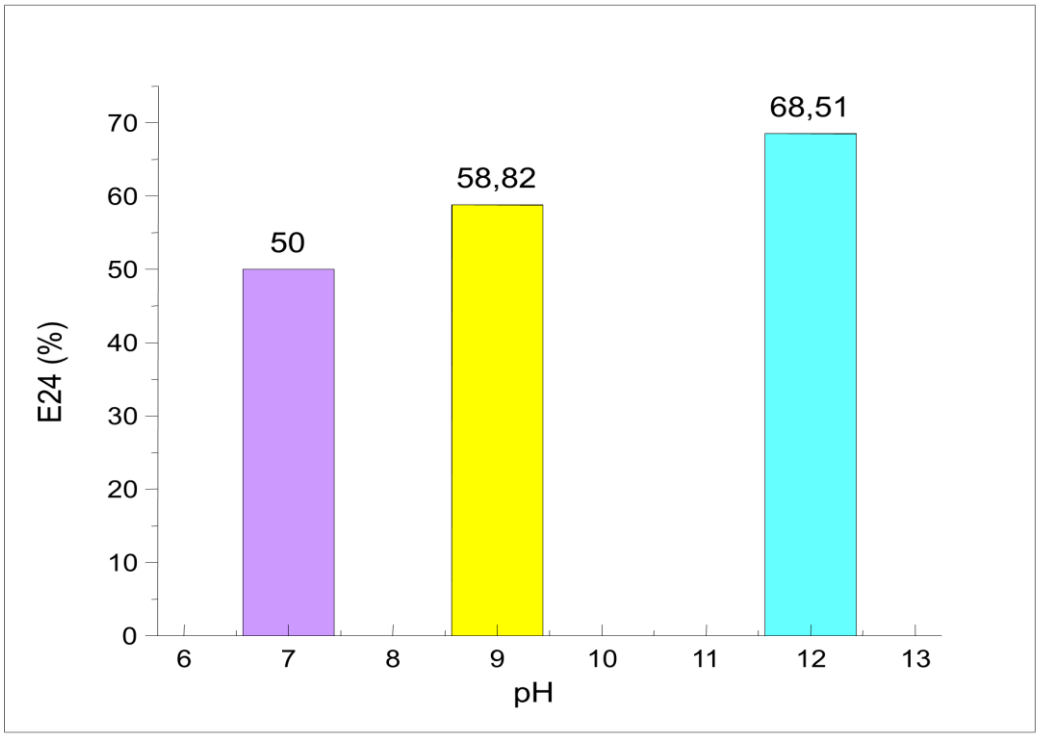


Figure V. 11 : représentation de l'effet de pH sur la stabilité de l'émulsion (avec émulsification).

b. Discussion des résultats :

D'après **La figure V.13**, le pH a une influence sur les propriétés tensioactives de l'oléate de saccharose. Par conséquent, L'indice de l'émulsification de l'émulsion de la solution de l'oléate de saccharose est augmenté sur une plage de **pH de 7 à 12** (à température

ambiante), tandis qu'une instabilité de l'émulsion a été observée à **pH acide de 2 à 4**, Ceci montre que la diffusion moléculaire des agents tensioactifs (oléate de saccharose) au niveau de l'interface eau-huile dépend de la nature du milieu (acide ou basique).

Des études montre que l'acidité ou la base de l'émulsion influence la stabilité de l'émulsion, l'ajoute d'acide ou de base peut affecter la charge électrique des particules de tension actifs ce qu'est influencer la stabilité des émulsions **[174].**

La compagnie de Sisterna qu'est intéressant à la synthèse des sucroesters indique que les sucroesteres sont stable à des valeurs de pH comprises entre 4 et 8. À des valeurs de pH supérieures à 8, une saponification de la liaison ester peut se produire. En milieu acide, les esters de saccharose sont chimiquement stables, mais à faible pH, ils peuvent devenir instables en raison de l'agrégation acide **[106].**

PYO, SANG-HYUN, et *al*, retrouver que les sucroester sont stable dans l'intervalle de pH [4 à 8]. **[166]**

V.2.8 Caractérisation structurale de l'oléate de saccharose par spectroscopie IR

- **Spectroscopie IR :**

Le spectre FT-IR d'oléate de saccharose brut est présenté sur **La figure V.12**. Ce spectre a été comparé à ceux du saccharose et de l'acide oléique **(Voir l'annexe : figure A.2 et A.3).**

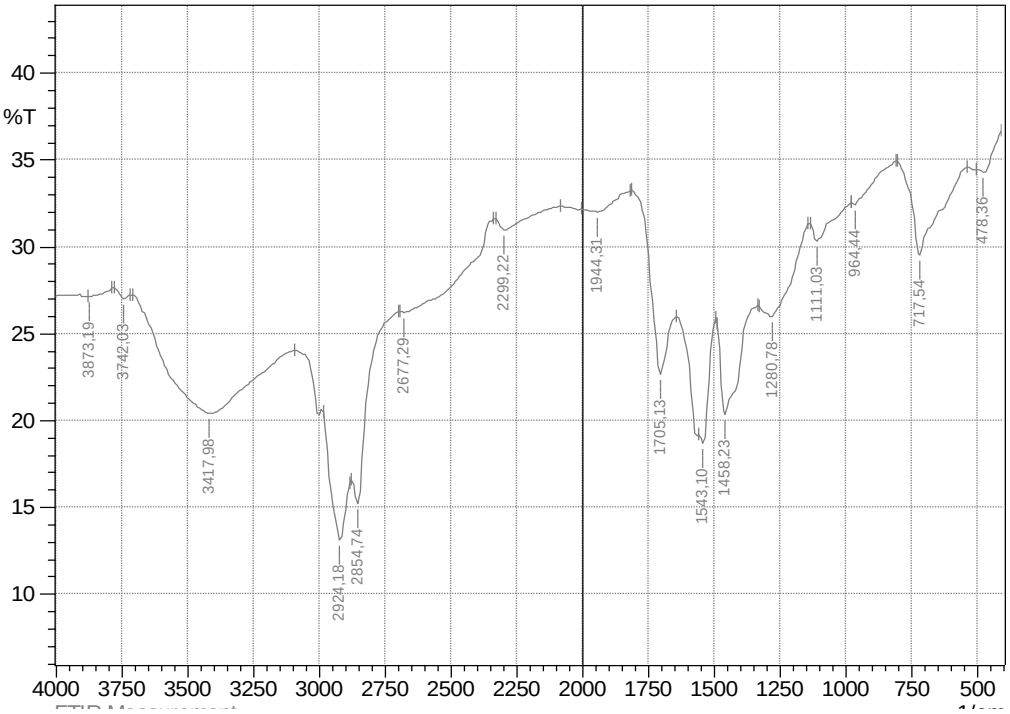


Figure V.12 : Spectre IR d'oléate de saccharose.

Le spectre IR est une représentation graphique de la transmission de la lumière infrarouge par une molécule. Les bandes d'absorption dans le spectre IR correspondent aux vibrations moléculaires spécifiques, qui sont liées aux liaisons chimiques et aux groupes fonctionnels présents dans la molécule de mono oléate de saccharose (SML) 6-0-oleaiosaccharose Bande forte et large entre 3200-3417 cm^{-1}: Cette bande est caractéristique de la vibration des liaisons O-H des groupes hydroxyles présents dans le saccharose, un disaccharide composé de glucose et de fructose , (2854-2924,18 cm^{-1}) C-H pour la longueur de chaîne de l'ester d'acide gras. Bandes d'étirement de la liaison O-C à 1357 cm^{-1} et 1112 cm^{-1}, 1705 cm^{-1} dues à la vibration d'étirement (C=O) du groupe ester. Les vibrations d'étirement (C-C), (C-O), (C-O-C) de la fraction pyranose du saccharose sont observées entre 1055 cm^{-1} et 1254 cm^{-1}. (953 cm^{-1}) anneau de pyranose. **[175].**

PARTIE « D » :

Applications de sucroesters

« Formulation de mayonnaise

Sans œufs »

INTRODUCTION

Les esters de sucres possèdent un avantage fonctionnel important, la large gamme de structures et donc de propriétés disponibles. De plus, ces composées sont non ioniques et par conséquent, relativement peu sensibles au pH et à la force ionique de leur environnement.

Pratiquement toutes les propriétés fonctionnelles des sucroesters et donc leurs applications sont liées à leur caractère tensioactif, lié à leur amphiphilité. C'est pourquoi leur classement doit être envisagé en termes d'équilibre entre les tendances hydrophile et hydrophobe.

Les sucroesters sont utilisées dans divers domaines notamment l'alimentaire, cosmétologie, pharmacie, agriculture, détergents. Ces applications sont rendues possibles par les propriétés émulsifiantes, stabilisantes.

Dans le but de mettre en évidence les propriétés émulsifiantes de l'oléate de saccharose, on a opté pour une formulation dans le domaine alimentaire, la mayonnaise. L'objectif est de tester l'efficacité de l'oléate de saccharose comme substituant de la lécithine contenue dans les œufs et qui joue le rôle d'émulsifiante huile dans l'eau durant la préparation de la mayonnaise.

VI. Généralités sur la mayonnaise :

VI.1 Caractéristiques de la mayonnaise :

La mayonnaise est une émulsion semi-solide d'huile (phase discontinue) et d'eau (phase continue). Elle possède des caractéristiques viscoélastiques en raison du réseau constitué par les lipoprotéines adsorbées autour des gouttes d'huile environnantes.

En raison de son faible pH et de sa forte teneur en graisse, elle présente une résistance assez élevée à la dégradation microbienne. Malgré les effets néfastes des levures et des moisissures, Les émulsions sont des systèmes métastables dispersés qui se composent d'au moins deux liquides non miscibles et d'un agent amphiphile (tensioactives). L'un des liquides se disperse dans le second sous forme de petites gouttes sphériques dont la taille varie en fonction des conditions de 0,1 à quelques dizaines de micromètres **[176].**



Figure VI.1 : Aspect et texture d'une sauce froide de type mayonnaise.

VI.2 Les ingrédients de mayonnaise :

La mayonnaise contient différents ingrédients selon la façon dont elle est préparée. Au niveau domestique (et/ou traditionnel), la mayonnaise est préparée à partir d'ingrédients simples, mais au niveau industriel, elle est préparée à partir de plusieurs ingrédients.

La mayonnaise traditionnelle est préparée en mélangeant soigneusement les jaunes d'œufs, le vinaigre, l'huile et les épices (notamment la moutarde) (**Figure VI.2**). La mayonnaise préparée selon cette méthode contient généralement 70 à 80 % de matières grasses **[177].**

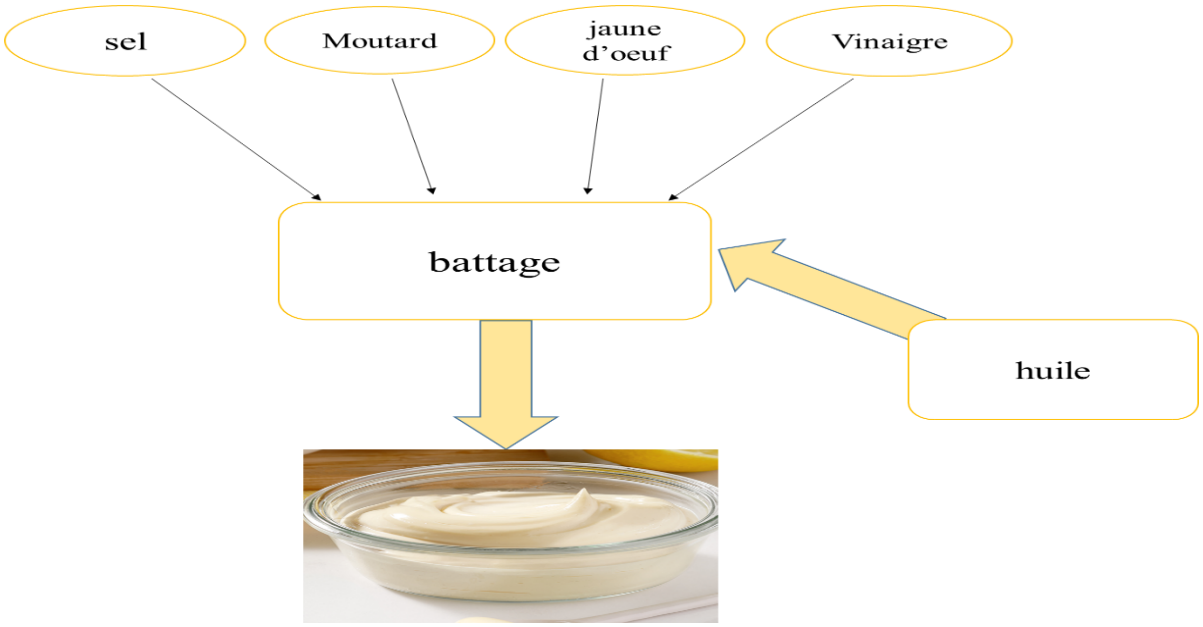


Figure VI.2 : Préparation traditionnelle de la mayonnaise.

Les sucroesters, esters d'acides gras et de saccharose, peuvent être utilisés comme émulsifiants dans la fabrication de mayonnaise industrielle. Ils permettent de stabiliser l'émulsion huile dans l'eau de la mayonnaise, en complément ou en remplacement partiel des émulsifiants naturels présents dans le jaune d'œuf.

Les sucroesters, notamment ceux à base d'acides gras comme l'acide palmitique et stéarique, et acide oléique, et confèrent une bonne stabilité à l'émulsion grâce à leur caractère tensioactif. Leur HLB (Balance Hydrophile-Lipophile) comprise entre 1 et 16 leur permet de stabilisé efficacement le mélange des phases huileuse et aqueuse de la mayonnaise.

À l'échelle industrielle, les sucroesters présentent l'avantage de permettre une production à Grande échelle de mayonnaise stable dans le temps, tout en limitant les quantités de jaune d'œuf nécessaires. Ils jouent un rôle crucial en stabilisant l'émulsion huile dans l'eau, aident à éviter la précipitation des matières solides, améliorant la dispersion, et préservant la cohésion de la matière grasse pendant surgélation. Ils permettent également d'améliorer le

volume la texture et la stabilité .Ils sont autorisés comme additif alimentaire sous la référence E473 dans certaines conditions **[172].**

- Dans notre travail en utilise l'oléate de saccharose issu de la synthèse enzymatique par la lipase immobilisée de graines de ricin « *Ricinus communis* » dans l'acétone. L'oléate de saccharose jouera le rôle d'émulsifiant qui peut remplacer la lécithine naturellement présente dans le jaune d'œuf pour formuler une sauce de mayonnaise.

VI.3 Matériel et méthode :

VI.3.1 Le but de l'étude :

L'objectif de ce travail est formuler une émulsion de type mayonnaise, et remplacer le jaune d'œuf par l'oléate de saccharose, et étudier leur stabilité sous le microscope optique.

VI.3.2 Matériel utilisé:

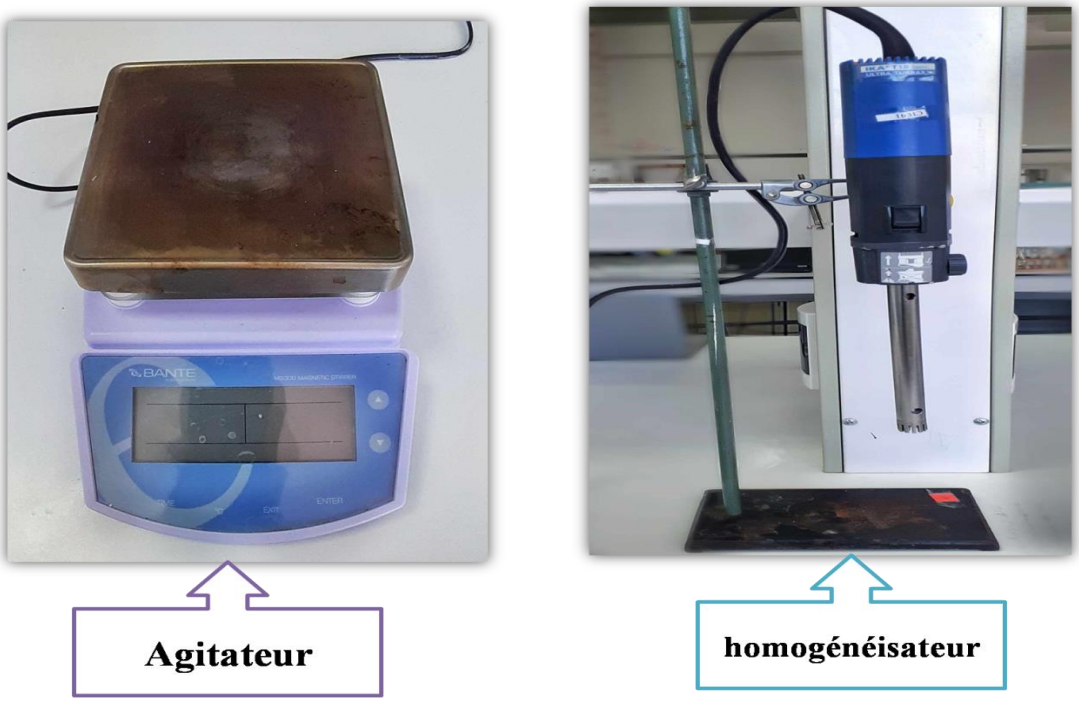


Figure VI.3 :L'agitateur et l'homogénéisateur.

VI.3.3 Les ingrédients alimentaires de la mayonnaise :

La composition de la mayonnaise diffère selon les sources. Il n'existe pas de formulation standard. Pour notre cas, l'idée est de remplacer le jaune d'œuf contenant la lécithine par l'oléate de saccharose. Le même pourcentage pondéral est conservé pour le substituant.

Tableau VI.1 : Différents ingrédients composant la mayonnaise sans œufs **[178].**

Ingrédients	Rôle	Quantité
Eau	Permet de disperser les molécules d'oléate de saccharose et contribue à la texture lisse de mayonnaise.	**5.9 ml**
Sel	Il apport de la saveur et équilibre le gout de mayonnaise.	**0.1g**
Amidon	Il est essentiel pour la texture et la consistance de la mayonnaise.	**0.2g**
Oléate de saccharose	Utilisé pour ses propriétés émulsifiantes entourent les gouttelettes d'huile et les maintiennent en suspension dans l'eau.	**0.5 g**
Huile d'olive	L'ingrédient de base de l'émulsion de la mayonnaise.	**3.3 ml**
Vinaigre blanc	Equilibrer le gout et aide à détendre une mayonnaise trop ferme en apportant de l'acidité.	**2.1ml**

VI.3.4 Préparation de l'échantillon de mayonnaise :

La mayonnaise a été fabriquée en laboratoire selon le Protocole suivant :

- On pèse dans un bécher les ingrédients des différentes phases :
  - **La phase 1 :** c'est la phase poudre (**sel (sole) + l'oléate de saccharose**)
  - **La phase 2 : huile d'olive** domicile **+ l'amidon.**
  - **La Phase 3 :** c'est la phase acide **{vinaigre} (SIDNA).**
- On mélange l'eau et les ingrédients de la phase poudre dans un bécher, on le laisse sous agitation pendant 10 min à une température ambiante,
- On verse la phase amidon + huile d'olive progressivement, en continuant de battre à l'aide d'un homogénéiser,
- Le vinaigre est introduit après l'obtention d'une masse dense et homogène,
- Pour réussir la mayonnaise tous les ingrédients doivent être à température ambiante,
- La mayonnaise est un produit sensible, elle doit être conservé dans au réfrigérateur,

L'émulsion de la mayonnaise est représenté dans **La figure VI.4** suivant :



Figure VI.4 : Section longitudinale section transversale de la mayonnaise.

VI.3.5 Analyses sensorielles :

Il est important dans la fabrication d'une mayonnaise. Les indicateurs de la qualité organoleptiques de la mayonnaise ont été déterminés selon les critères suivants : aspect, couleur, odeur, saveur et texture.

Dans notre étude, nous avons étudié les propriétés sensorielles suivantes :

Tableau VI.2 : Regroupe les propriétés sensorielles de la mayonnaise **[179] [180]**

propriétés sensorielles	**Explication**	**Nos résultats**
Aspect	il est nécessaire de voir d'un coup d'œil s'il y a des anomalies dans l'échantillon. Et avoir la stabilité qui observé par une absence de séparation des deux phases.	Il n'ya pas une séparation, c'est à dire l'absence de 2 phases. Donc on peut dire que l'émulsion.de mayonnaise est stable
Odeur	Les odeurs de produits, qu'elles soient agréables ou désagréables, sont perçues par les récepteurs olfactifs du nez.	Nous avons senti l'odeur d'huile d'olive et le vinaigre

Couleur	La couleur des aliments est visible et importante dans le choix de ce qu'on mange.	On observe une couleur jaune claire à cause d'huile d'olive qui devient foncée jour après jour.
Gout	le goût est reconnu par les papilles en bouche. Les goûts perceptibles sont sucrés, salés, acides, amers et épicés.	Un gout salé avec acidité de vinaigre
Texture	L'analyse de texture consiste donc à observer l'élasticité, la consistance de mayonnaise par la méthode simple d'écoulement.	On observe une texture visqueuse et lourde, et homogène et bonne élasticité et consistance.

VI.3.6 Analyse de la microstructure :

Les paramètres principaux étudiés pour décrire la microstructure d'une émulsion de mayonnaise sont la taille, la distribution de taille des gouttelettes et leur organisation, en utilisant le microscope optique.

VI.3.6.1 Microscope optique avec caméra :

A. La composition de microscope :

- **Caméra :**

Cet appareil photo numérique combiné avec un oculaire 10x intégré est le moyen idéal pour visualiser des images en couleur directement de votre microscope à votre ordinateur via le port USB.

- **Microscope optique** :

Microscope trin oculaire OPTIKA B-500 Tpl, il est conçu pour déterminer la taille et la distribution de taille des gouttelettes d'émulsion et leurs changements dans le temps à l'aide d'un logiciel (TS View).C'est une technique relativement simple et rapide qui permet c'est possible **[181]**



Figure VI.5 : microscope optique.

VI.3.6.2 Principe :

Les microscopes optiques utilisent la lumière. Il existe deux lentilles :

- ✓ L'objectif pour agrandir l'objet observé (avec différents grossissements).
- ✓ l'oculaire est réglez de manière à ce que le faisceau lumineux soit parallèle à votre œil et que votre œil soit au repos.

Un équipement supplémentaire permet de régler l'intensité lumineuse (ouverture) ou la mise au point (molette reliée au système de crémaillère) pour une observation précise des échantillons placés sur la table d'échantillons.

La résolution d'un microscope optique est limitée par la diffraction de la lumière et ne peut excéder 0,2 micromètre. Des techniques permettent de s'approcher de cette limite : l'utilisation de lentilles à immersion (dans l'huile) ou le raccourcissement de la longueur d'onde de la lumière (mais limité à la lumière visible) **[181]**

⇒ **Avant l'observation au microscope :**

- Dans une lame micrométrique verser une petite goutte de la mayonnaise.
- Poser la lamelle délicatement sur l'objet à observer.
- Avec un doit appuyer sur la lamelle pour faire dispersé l'échantillon en fine couche.

⇒ **Utilisation du microscope : [180]**

- Brancher la photo microscope et la camera
- Installation du logiciel TS View
- Configuration du port USB pour la camera

- Configuration du contraste et/ou lumière : AUTO WHITE BALANCE (image noir et blanc)
- La mise au point de la lame
- Lentille frontale escamotable
- Prendre la photo

⇒ **Discussion des résultats :**

L'analyse microscopique donne une bonne précision concernant la répartition des gouttelettes d'huiles dans la phase aqueuse pour savoir l'évolution de la stabilité de l'émulsion. L'échantillon de mayonnaise préparée est mis sous microscope pour observer la distribution des gouttelettes. Les images microscopiques de la mayonnaise sont présentées dans **La figure VI.6.**

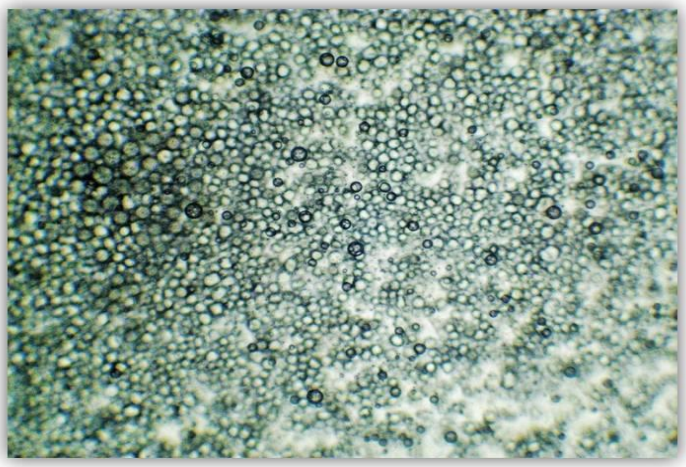


Figure VI.6 : Vue au microscope de la sauce de mayonnaise

La figure VI.6 montre une dispersion des gouttelettes huileuses sphériques ou arrondis dans la phase aqueuse qui contient ingrédients de la phase 1 et 3 sous microscope optique.

La taille des gouttelettes formant la phase dispersée d'une émulsion huile dans l'eau est typiquement de l'ordre de (1 à 10 µm) donc notre mayonnaise est stable.

Il existe au niveau de toute interface entre deux milieux différents non miscibles, une force appelée la tension interfaciale. Les conditions d'agitation telles que le temps d'émulsification et la vitesse d'agitation ont une influence capitale sur la taille des gouttes d'une émulsion **[182].**

Un des objectifs majeurs lors de la formulation d'une émulsion stable est donc de réduire la tension interfaciale. Cela est possible en ajoutant des molécules capables d'abaisser cette barrière énergétique.

Des tensioactifs comme les sucroester sont été ajoutés lors de la formation des émulsions avec différents pourcentages, le tensioactif s'absorbe à l'interface liquide-liquide et va ainsi modifier la tension interfaciale.

En effet, à faible concentration ils ont la faculté d'augmenter la viscosité de la phase hydrophile et permettent de ralentir la migration des gouttelettes au sein de l'émulsion et donc de retarder les phénomènes de déstabilisation.

Notons que la quantité de sucroester incorporée dans la formulation affecte aussi les propriétés rhéologiques de l'émulsion (viscosité, écoulement….). D'autres ingrédients sont aussi nécessaires tels que les épaississants et les agents conservateurs. Par conséquent, il est recommandé de mener une étude approfondie afin d'optimiser la formulation de la mayonnaise et atteindre les objectifs requis pour un produit fini industriel de qualité.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION :

Dans cette étude, l'objectif principal est de démontrer le pouvoir catalytique d'une enzyme végétale, la lipase de ricin « Ricinus communis » dans la synthèse d'un composé à haute valeur ajoutée, un sucroester, appartenant à une classe originale de tensioactifs non ioniques, obtenus à partir d'agro-ressources qui sont les glucides et les acides gras. La synthèse du sucroester est une réaction d'estérification entre un sucre simple, le saccharose, et un acide gras, l'acide oléique, qui réagissent suivant le mécanisme d'estérification catalysée par la lipase de ricin.

Les conditions opératoires ont été optimisées pour l'élaboration d'un procédé durable. Tout d'abord, on s'est intéressée à préparer la lipase à partir des graines oléagineuses connues pour leur activité lipasique, les graines de ricin. Par la suite, le biocatalyseur séparé a été partiellement purifié puis immobilisé dans l'alginate de calcium afin d'obtenir une plus grande stabilité en vue de son utilisation en milieu organique. D'autre part, cette immobilisation a permis de conserver l'enzyme active pour être réutilisée ce qui est d'un grand intérêt en vue d'une application à l'échelle industrielle.

L'oléate de saccharose a été ainsi synthétisé avec succès dans des conditions réactionnelles douces. Il a été prouvé que la synthèse du l'oléate de saccharose était affectée par divers paramètres qui ont été optimisés afin de maximiser le rendement de la réaction. Les résultats obtenus montrent que, la conversion la plus élevée du saccharose et de l'acide oléique a été obtenue dans l'acétone comme solvant en présence de **30 UI** de lipase immobilisée et sous agitation de 400 rpm. La présence d'une teneur minimale en eau ($a_w = 0{,}24$) est nécessaire pour que l'enzyme soit dans sa forme active et pour que la réaction d'estérification soit favorisée en suite à l'augmentation de la solubilité du saccharose. Un rapport molaire des réactifs ($n_{saccharose}/n_{acide\ oléique}$) de $1/1$ permet de mener la réaction pendant une durée de 2 heures sous la température optimale de 50°C. Le rendement maximal obtenu était de 68% de conversion de l'acide oléique.

Après avoir identifié les conditions idéales pour la réaction de synthèse, les produits de synthèse (oléate de saccharose) ont été séparés et purifiés pour déterminer leurs caractéristiques structurelles et fonctionnelles. L'oléate de saccharose possède un HLB de 13,24 ce qui caractérise un émulsifiant idéal pour les émulsions huile dans l'eau (H /E), malgré son faible pouvoir moussant. L'émulsion Huile d'olive dans la solution aqueuse d'oléate de saccharose a été émulsifiée à 70% pour une durée de 24 heures.

L’émulsion huile d’olive dans la solution aqueuse d’oléate de saccharose était stable sur un large intervalle de température (20°C à 100 °C), ce qui signifie que notre produit est thermostable. Une stabilité vis-à-vis du pH compris entre 9 à 12 a été également constatée. La présence du sel (chlorure de sodium), à une concentration 0 ,1 g / L, peut accroitre les taux d’émulsification de la solution de l’oléate de saccharose.

L’oléate de saccharose, a été utilisé comme émulsifiant dans la fabrication d’une mayonnaise sans œufs. Il permet de stabiliser l’émulsion huile dans l’eau de la mayonnaise, remplacement partiel des émulsifiants naturels présents dans le jaune d’œuf.

Permet les prescriptives dans l’utilisation du pouvoir catalytique d’une lipase végétale dans la synthèse d’un composé a haute valeur ajoutée qui peut réaliser au future sont :

- La synthèse du sucre ester en utilisant un autre type de lipase (animale ou microbienne).
- Etude de l'effet d'un autre type de solvants tel que les solvants ioniques.
- L'utilisation d'agent déshydratant, tels que les tamis moléculaires afin de réduire l'effet inhibiteur de l'eau formée par l’estérification.
- La synthèse dans un système biphasique aqueux (saturé en sucre)-organique.

ANNEXES

ANNEXE

A.1. Les indices :

a. Indice de saponification (Is) : [65]

Est une mesure qui indique la quantité de KOH en (mg) nécessaire pour neutraliser l'acide libre et saponifier thermiquement l'ester de 1 g d'ester de saccharose, présenter en (mg de KOH /g de sucroester).

$$Is = C_{HCL}(V' - V)\, M_{KOH} * \frac{1}{m} \quad \text{..... (Eq. 1)}$$

Avec :

- C_{HCL}: Concentration en HCl (mol/l),
- **V'** : volume d'HCl nécessaire à la neutralisation du blanc (l),
- **V** : volume de HCl nécessaire à la neutralisation de l'échantillon (l),
- M_{KOH} : Masse molaire de KOH (mg/mol),
- **m** : masse d'échantillon (ester de saccharose) (g).

➢ **Mode opératoire :**

- Dans un ballon de 250 ml de verre borosilicaté munie d'un réfrigérant à reflux,
- On introduit la prise d'essai (m = 0,5g) de oléate de saccharose,
- On ajoute 12,5 ml d'hydroxyde de potassium alcoolique KOH 0,25M avec quelques quantité de pierre ponce,
- On adapte le réfrigérant et on chauffe à reflux pendant 30 min,
- On ajoute 0,5 ml de solution de phénophtaléine et on titre immédiatement par l'acide chlorhydrique (HCl) de 0,25M [V (ml) d'Acide Chlorhydrique 0,25M],
- On effectue un essai à blanc (sans l'oléate de saccharose dans les mêmes conditions [V' (ml) d'Acide Chlorhydrique 0,25M] .



Figure A.1 : montage de chauffage à reflux.

b. Indice d'acidité (Ia): [183]

Le nombre en (mg) de KOH nécessaire pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1g de l'oléate de saccharose (mg de KOH /g de l'oléate de saccharose) (**Eq.2)**

- **Mode opératoire :**

- Peser une masse $m_{\text{oléate de saccharose}}$ = 5g dans une fiole d'erlenmayer,
- Ajouter une solution d'éthanol 25%,
- 10 ml KOH à environ 0.2M (pipette jauge),
- Bien agiter puis attendre 10 min exactement,
- Faire le dosage de témoin pendant cet intervalle de temps,
- Ajouter 3 gouttes de l'indicateur colore phénolphtaléine,
- Neutraliser les ions OH^- restant dans le mélange réactionnel par la solution HCl de concentration connu versée à la burette graduée.

Le témoin: Un témoin sera réalisé dans les mêmes conditions que l'essai mais sans l'oléate de saccharose.

$$\mathbf{Ia} = C_{HCL}(V' - V)\, M_{KOH} * \frac{1}{m} \quad \text{.....(Eq.2)}$$

A.2. Spectres IR de l'acide oléique et de saccharose :

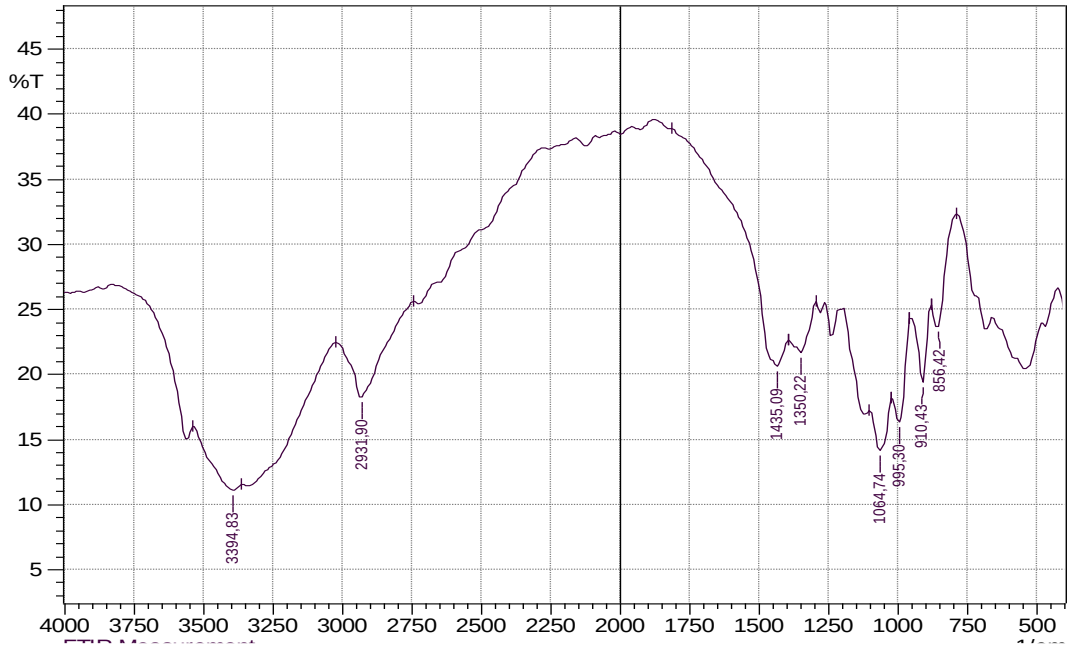


Figure A.2 : Spectre IR de saccharose

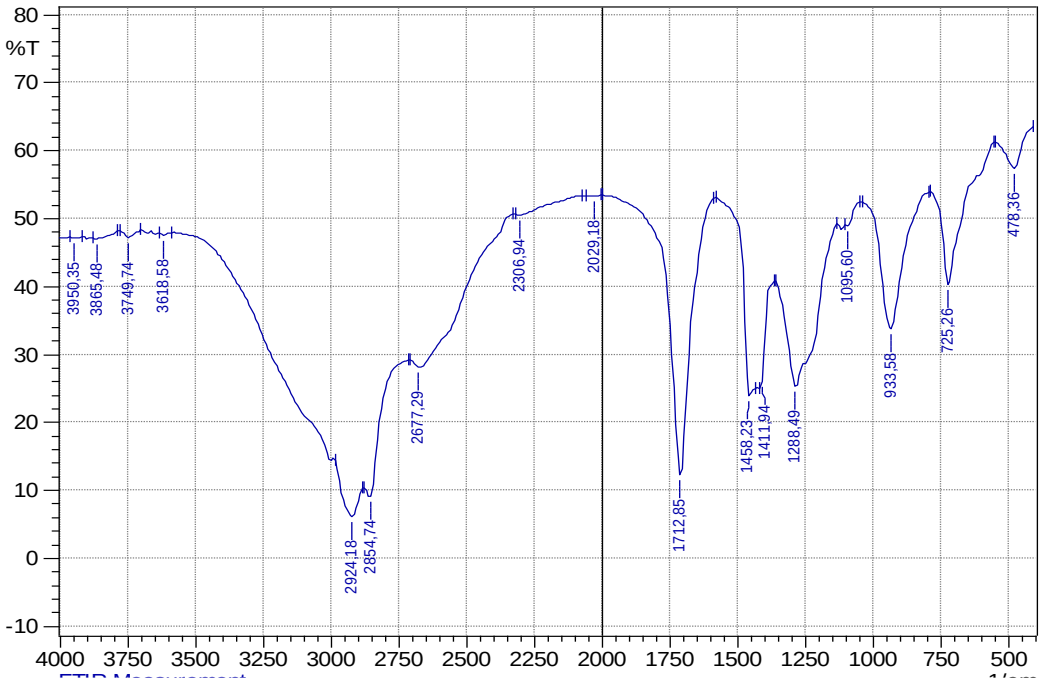


Figure A.3 : Spectre IR de l'acide oléique

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE :

[1]: PATEL, Naveen., RAI, Dhananjai, SHAHANE, Shraddha, *et al.* Lipases: sources, production, purification, and applications. *Recent patents on biotechnology*, 2019, vol. 13, no 1, p. 45-56.

[2]: ALLOUE, Wazé Aimée Mireille, DESTAIN, Jacqueline, GHALFI, Hakim, *et al.* Les lipases immobilisées et leurs applications. *BASE*, 2008.

[3]: LAGRARI, Chada. *Production améliorée des lipases à partir du Rhizopus oryzae NRRL 1526 en utilisant la biomasse lignocellulosique dans un milieu de fermentation liquide*. 2019. Thèse de doctorat. Institut National de la Recherche Scientifique (Canada).

[4]: http://membres.multimania.fr/jcbouchez/ENZYMEOK.html

[5]: SINGH, M., CHANDRAVEER, M., et TRIPATHI, A. Isolation and Screening of Lipase Producing Microorganisms from Natural Sources. *Indian Journal of Ecology*, 2017, vol. 44, no 1, p. 19-23.

[6]: **NAJJAR, Amal.** *Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez Yarrowialipolytica lors de sa croissance en présence d'huile d'olive*. 2010. Thèse de doctorat. Aix-Marseille 2

[7]: ZALLOT, Rémi. *Identification et caractérisation d'une lipase exprimée pendant l'hydrolyse des réserves chez Arabidopsis thaliana*. 2011. Thèse de doctorat. Bordeaux 2.

[8]: LARBI DAOUADJI, Kelthoum, *et al.* *Isolement et identification des souches productrices de lipase*. 2015. Thèse de doctorat

[9]: DE OLIVEIRA, Eduardo Basilio. *Simulations moléculaires appliquées à l'acétylation de flavonoïdes catalysée par des lipases: influence des structures de la lipase e du flavonoïde sur la régiosélectivité de la bioconversion*. 2009. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine-INPL

[10]: EHLERT, Janna, KRONEMANN, Jenny, ZUMBRÄGEL, Nadine, *et al.* Lipase-catalyzed chemoselective ester hydrolysis of biomimetically coupled aryls for the synthesis of unsymmetric biphenyl Esters. *Molecules*, 2019, vol. 24, no 23, p. 4272..

[11]: EGLOFF, Marie-Pierre, RANSAC, Stephane, MARGUET, Frank, *et al.* Enzymes lipolytiques et lipolyse. *Ol. Corps Gras Lipides*, 1995, vol. 2, p. 52

[12]: KHAN, Faez Iqbal, LAN, Dongming, DURRANI, Rabia, *et al.* The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2017, vol. 5, p. 16.

[13]: FAN, Yu, XU, Yang, HAN, Qing-Guo, et al. Exploring inhibition mechanism and nature of lipase by Ligupurpuroside A extracted from Ku-Ding tea. Medicinal Chemistry Research, 2018, vol. 27, p. 1822-1833

[14]: BENEDETTI, Fabio, BERTI, Federico, LINDA, Paolo, *et al.* Modeling of solvent effects in the activation of the lipase from Rhizomucormiehei. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1996, vol. 6, no 7, p. 839-844

[15]: GARGOURI, Youssef, RANSAC, Stéphane, et VERGER, Robert. Covalent inhibition of digestive lipases: an in vitro study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1997, vol. 1344, no 1, p. 6-37.

[16]: MARUYAMA, Tatsuo, NAKAJIMA, Mitsutoshi, UCHIKAWA, Sosaku, *et al.* Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2000, vol. 77, p. 1121-1127.

[17]: FICKERS, Patrick, DESTAIN, Jacqueline, et THONART, Philippe. Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 2008, vol. 12, no 2.

[18]: SARMAH, Nipon, REVATHI, D., SHEELU, G., *et al.* Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnologyprogress*, 2018, vol. 34, no 1, p. 5-28.

[19]: LEDENT, C. et MAIRESSE, M. Allergie champêtre. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 2008, vol. 48, no 2, p. 109-110

[20]: SAILAJA, M., TARAKESWARI, M., et SUJATHA, M. Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis L.*) via particle gun-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. Plant Cell Reports, 2008, vol. 27, p. 1509-1519

[21]: https://www.esthetica-pure-nature.com/ricin

[22]: LITTLE, Elbert Luther, WOODBURY, Roy O., ET WADSWORTH, Frank Howard. Trees of Puerto Rico and the Virgin islands. US Department of Agriculture, Forest Service, 1974.

[23]: AFAF radia Extraction et caractérisation partielle des lectines de Ricinus communis 2016 Mémoire de Master Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

[24]: https://www.aquaportail.com/

[25]: MOHD ZIN, Nur Bainun, MOHAMAD YUSOF, Busyra, OSLAN, Siti Nurbaya, *et al*. Utilization of acid pre-treated coconut dregs as a substrate for production of detergent compatible lipase by Bacillus stratosphericus. *AMB Express*, 2017, vol. 7, p. 1-13.

[26]: SUWANNO, Saowakon, RAKKAN, Thanaphorn, YUNU, Tewan, *et al.* The production of biodiesel using residual oil from palm oil mill effluent and crude lipase from oil palm fruit as an alternative substrate and catalyst. *Fuel*, 2017, vol. 195, p. 82-87.

[27]: HAMDEN, Khaled, KESKES, Henda, ELGOMDI, Othman, *et al*. Modulatory effect of an isolated triglyceride from fenugreek seed oil on of α-amylase, lipase and ACE activities, liver-kidney functions and metabolic disorders of diabetic rats. *Journal of oleo science*, 2017, vol. 66, no 6, p. 633-645.

[28]: BARROS, M., FLEURI, L. F., et MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties-a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2010, vol. 27, p. 15-29.

[29]: CHAHINIANA, H. et SARDA, L. Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. *Protein and peptide letters*, 2009, vol. 16, no 10, p. 1149-1161.

[30] : GARGOURI, Y., JULIEN, R., PIERONI, G., *et al*. Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins. *Journal of lipidresearch*, 1984, vol. 25, no 11, p. 1214-1221.

[31]: https://nutrixeal-info.fr/index/lipase-linguale/amp

[32]: MORIGNY, Pauline et LANGIN, Dominique. Un partenariat inattendu dans l'adipocyte-Une enzyme, la lipase-hormonosensible, et un facteur de transcription, ChREBP, contrôlent de concert la sensibilité à l'insuline. *médecine/sciences*, 2019, vol. 35, no 6-7, p. 501-503.

[33]: RIHANI, Alima. *Screening de microorganismes producteurs de lipases: application dans la biodécontamination de surface*. 2012. Thèse de doctorat. Université de Annaba-Badji Mokhtar.

[34]: FATIMA, Samar, FARYAD, Amna, ATAA, Asia, *et al*. Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. *Biotechnology and appliedbiochemistry*, 2021, vol. 68, no 3, p. 445-458.

[35]: SAMMOUR, REDA HELMY AHMED. Purification and partial characterisation of an acid lipase in germinating lipidbodylinseedlings. *Turkish Journal of Botany*, 2005, vol. 29, no 3, p. 177-184

[36]: RICHARD, Romain. *Transestérification éthanolique d'huile végétale dans des microréacteurs: transposition du batch au continu*. 2011. Thèse de doctorat.

[37]: ALLOUNE, Rhiad. Le biodiesel: une source d'énergie propre et prometteuse. *Bulletin des Energies Renouvelables*, 2012, no 22.

[38]: LONGHI, Sonia et CAMBILLAU, Christian. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1999, vol. 1441, no 2-3, p. 185-196.

[39]: TAN MUIKENG, Tan MuiKeng et NIESSEN, L. M. Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of, Fusarium species causing crown rot and head blight of cereals. 2003.

[40]: GILHAM, Dean et LEHNER, Richard. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 2005, vol. 36, no 2, p. 139-147.

[41]: REIS, Pedro, HOLMBERG, Krister, WATZKE, Heribert, *et al*. Lipases at interfaces: a review. *Advances in colloid and interface science*, 2009, vol. 147, p. 237-250

[42]: ALLOUÉ, Wazé Aimé Mireille. Formulation et immobilisation de la lipase de Yarrowia lipolytica. 2008.

[43]: COMBES, M. Didier et DUBREUCQ, M. Eric. Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique. 2008.

[44]: https://www.memoireonline.com

[45]: KUMAR, S. Suresh et GUPTA, Rani. An extracellular lipase from Trichosporonasahii MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. *Process Biochemistry*, 2008, vol. 43, no 10, p. 1054-1060.

[46]: ZHAO, Xueyan, EL-ZAHAB, Bilal, BROSNAHAN, Ryan, *et al*. An organic soluble lipase for water-free synthesis of biodiesel. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2007, vol. 143, p. 236-243.

[47]: STERGIOU, Panagiota-Yiolanda, FOUKIS, Athanasios, FILIPPOU, Michalis, *et al*.Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology advances*, 2013, vol. 31, no 8, p. 1846-1859.

[48]: https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/14303/esterification

[49]: RAHIM Mohamed Etude de la réaction d'estérification 2011 thèse de magistère Université 08 Mai 1945 Guelma Faculté des Sciences et des Sciences de l'Ingénieur

[50]:http://www.foad.uadb.edu.sn/pluginfile.php/2885/mod_folder/content/0/livre%20chimie%20organique.pdf?forcedownload=1

[51]: https://aurore.unilim.fr/theses/nxfile/default/c5989fa6-2ed7-4229-baab-038b026c5f87/blobholder:0/2005LIMO0032.pdf

[52]: https://theses.hal.science/tel-00266895v2/document63Il

[53]: https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/esterification.

[54]: https://www.researchgate.net/figure/Reactions-catalyzed-by-lipases_fig1_327016509

[55]: GUNSTONE, Frank D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, vol. 79, no 12, p. 1535-1549.

[56]: ZAKS, A. New enzymatic properties in organic media. In : *Enzymatic reactions in organic media*. Dordrecht : Springer Netherlands, 1996. p. 70-93.

[57]: SRIDHARAN, R. et IM, MATHAI. TRANSESTERIFICATION OF METHYL BENZOATE TO AMYL BENZOATES. 1979.

[58]: VEDRINE, J. C. Méthodes expérimentales de caractérisation des catalyseurs industriels. *Revue de Physique Appliquée*, 1981, vol. 16, no 7, p. 373-386

[59]: ABOÏNAG. T., 'Production de biodiesel par trans-esterification alcoolique : étude sur réacteur pilote', Ouagadougou, Burkina Faso, pages 12-17, juin 20019.

[60]: FREEDMAN, B. E. H. P., PRYDE, E. H., et MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1984, vol. 61, p. 1638-1643.

[61]: COULON, Denis. *Étude d'un procédé de synthèse enzymatique d'esters de sucre et d'acide gras*. 1997. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.

[62]: ABDEL-MAGEED, Heidi Mohamed, NADA, Dina, RADWAN, Rasha Ali, *et al.* Optimization of catalytic properties of Mucor racemosus lipase through immobilization in a biocompatible alginate gelatin hydrogel matrix for free fatty acid production: a sustainable robust biocatalyst for ultrasound-assisted olive oil hydrolysis. *3 Biotech*, 2022, vol. 12, no 11, p. 285.

[63]: LAN, Dongming, HOU, Shulin, YANG, Ning, *et al*. Optimal production and biochemical properties of a lipase from Candida albicans. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, vol. 12, no 10, p. 7216-7237.

[64]: ORY, Robert L. Acid lipase of the castor bean. *Lipids*, 1969, vol. 4, no 3, p. 177-185.

[65]: FARIDA, Sefha. *Etude de l'activité enzymatique d'une lipase végétale sous forme libre et immobilisée*. 2011. Thèse de doctorat. Médéa, Université Yahia Farés. Faculté des Sciences et de la Technologie.

[66]: RANI GUPTA, Rani Gupta, ARTI KUMARI, Arti Kumari, POONAM SYAL, Poonam Syal, et al. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. 201

[67]: CASTELLO, Philippe. Utilisation des lipases en panification française (effets technologiques, modifications biochimiques et modalités d'emploi*)*. 1999. Thèse de doctorat. École nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires (Massy, Essonne; 1893-2006)

[68]:https://patentimages.storage.googleapis.com/4f/fa/2b/3ca54fb463aa51/WO1999052372A1.pdf

[69]: GUERRAND, David. Lipases industrial applications: focus on food and agro industries. OCL Oil seeds and fats crops and lipids, 2017, vol. 24, no 4, p. D403.

[70]: KONWAR, B. K. et SAGAR, Kalpana. *Lipase: an industrial enzyme through metagenomics*. Apple Academic Press, 2018.

[71]: CHAUHAN, Mamta, CHAUHAN, Rajinder Singh, GARLAPATI, VijayKumar, *et al.* Evaluation of a new lipase from Staphylococcus sp. for detergent additive capability. *BioMedresearch international*, 2013, vol. 2013.

[72]: NARS, Guillaume. *Dynamique fonctionnelle des protéines: études d'une lipase et d'une protéine A de la membrane externe de bactérie*. 2015. Thèse de doctorat. Université Toulouse 3 Paul Sabatier.

[73]: HEISLER, Andreas. *Utilisation des lipases en synthese organique selectivite vis-a-vis des glycerides et application aux systemes triols resolution des acides aminophosphoniques analogues de l'isoserine et de l'isothreonine*. 1994. Thèse de doctorat. Nantes.

[74]: MORIN, Pierre. Applications des lipases en synthèse énantiosélective. 2010.

[75]: LAOUAOUDJA, Wafa, KAHILI, Rima, KERADA, Yamina, *et al.* *Les applications industrielles des lipases microbiennes*. 2008. Thèse de doctorat. Université de Jijel.

[76]: GODET, Stéphanie. *Isolement et caractérisation de trois gènes codant une lipase et deux estérases hypothétiques chez la microalgue marine Isochrysisgalbana (Prymnesiophyceae, Haptophyta)*. 2008. Thèse de doctorat.

[77]: SONI, Sunil, DESAI, J. D., et DEVI, Surekha. Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase by entrapment and covalent binding to polymeric supports. *Journal of applied polymer science*, 2001, vol. 82, no 5, p. 1299-1305.

[78]: GHASEMI, Mahsa. *Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma*. 2007. Thèse de doctorat. Chimie ParisTech.

[79]: ZABORSKY, Oscar R. [24] Immobilized enzymes—miscellaneous methods and general classification. In : *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1976. p. 317-332.

[80]: HAMAD, Hussein. Études des méthodes d'immobilisation d'enzyme (trypsine) sur un support solide pour la cartographie peptidique par microréacteur. 2004.

[81]: BARHOUMI, Houcine. *Elaboration et caractérisations de nouvelles membranes enzymatiques pour l'application" biocapteur" en hémodialyse rénale*. 2006. Thèse de doctorat.

[82]: VAUBOURDOLLE, Michel. *Toxicologie, sciences mathématiques, physiques et chimiques*. Wolters Kluwer France, 2007.

[83]: PINA, Michel, SEVERINO, Liv S., BELTRÃO, Napoleão EM, et al. De nouvelles voies de valorisation pour redynamiser la filière ricin au Brésil. Cahiers Agricultures, 2005, vol. 14, no 1, p. 169-171 (1).

[84]: CECCHIN, Mireille. *Domaines d'application des sucroesters et sucroglycérides*. 2001. Thèse de doctorat. ENSSIB.

[85]: VOET, Donald, VOET, Judith G., PRATT, Charlotte W., et al. Fundamentals of biochemistry. New York : Wiley, 2002

[86]: SOULTANI, Samia. *Synthèse enzymatique d'esters de fructose et d'acide gras: cinétique, purification et caractérisation des propriétés tensioactives*. 2001. Thèse de doctorat. éditeur inconnu.

[87]: BAKER, Irene JA, MATTHEWS, Barry, SUARES, Hector, *et al.* Sugar fatty acid ester surfactants: structure and ultimate aerobic biodegradability. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2000, vol. 3, no 1, p. 1-11.

[88]: NAGAHARA, Kunishige, SUZUKI, Takehisa, et NAKAMURA, Shoji. Longitudinal changes in the skeletal pattern of deciduous anterior crossbite. The Angle Orthodontist, 1997, vol. 67, no 6, p. 439-446.

[89]: ZHAO, Kai-Hua, CAI, Yu-Zheng, LIN, Xiao-Sheng, *et al*. Enzymatic synthesis of glucose-based fatty acid esters in bisolvent systems containing ionic liquids or deep eutectic solvents. *Molecules*, 2016, vol. 21, no 10, p. 1294

[90]: HAUTHAL, H. G. Trends in surfactants. *Chimica oggi*, 1992, vol. 10, no 5, p. 9-13.

[91]: PICCICUTO, Salvator, BLECKER, Christophe, BROHÉE, Jean-Christophe, *et al*. Les esters de sucres: voies de synthèse et potentialités d'utilisation. *BASE*, 2001.

[92]: WHITEHURST, Robert J, et al. (ed.). Emulsifiers in food technology. Ames, IA : Blackwell Pub., 2004

[93]: OTOMO, Naoya. Basic properties of sucrose fatty acid esters and their applications. *Hayes DG; Kitamoto D; Solaiman DK Y; Ashby RD (eds), Biobased Surfactants and Detergents: Synthesis, Properties, and Applications, AOCS Press, Urbana, Illinois*, 2009, p. 275-298.

[94]: VARGAS, Jorge Andrés Mora, ORTEGA, Julieth Orduña, METZKER, Gustavo, *et al.* Natural sucrose esters: Perspectives on the chemical and physiological use of an under investigated chemical class of compounds. *Phytochemistry*, 2020, vol. 177, p. 112433.

[95]: BRISSON, Germain. Lipides et nutrition humaine: analyse des données récentes sur les corps gras alimentaires. Presses Université Laval, 1982

[96]: KARLESKIND, Alain (ed.). *Manuel des corps gras*. Technique et Documentation-Lavoisier, 1992.

[97]: SOUMIA, Bouiba, CHADLI, Samir, *et al.* *Formulation et caractérisation d'émulsion huile/eau d'une mayonnaise à base d'huile de fruit de Pistacia Lentiscus*. 2021. Thèse de doctorat. UNIVERSITE AHMED DRAIA-ADRAR.

[98]: SIRET, Claude. *Les composants chimiques des produits alimentaires*. Ed. Techniques Ingénieur, 2004

[99]: GUTIÉRREZ, Ma Fernanda, ORJUELA, Álvaro, RIVERA, J. Luis, *et al.* Production of sucroesters using solvent-free reactive systems containing emulsifiers. *Ingeniería e Investigación*, 2018, vol. 38, no 1, p. 16-23.

[100]: AHSAN, Fakhrul, ARNOLD, John J., MEEZAN, Elias, *et al.* Sucrose cocoate, a component of cosmetic preparations, enhances nasal and ocular peptide absorption. *International journal of pharmaceutics*, 2003, vol. 251, no 1-2, p. 195-203.

[101]: MATEV, G., PETKOVA, N., VRANCHEVA, R., *et al.* Characterization and application of sucroesters as antimicrobial agents. *University of Plovdiv" Paisii Hilendarski", Scientific Studies–Chemistry*, 2013, p. 1-7.

[102]: NETA, Nair S., TEIXEIRA, José A., et RODRIGUES, Lígia R. Sugar ester surfactants: Enzymatic synthesis and applications in food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, vol. 55, no 5, p. 595-610.

[103]: PLOU, Francisco J., CRUCES, M. Angeles, FERRER, Manuel, et al. Enzymatic acylation of di-and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. Journal of Biotechnology, 2002, vol. 96, no 1, p. 55-66

[104]: LOUBAT-BOULEUC, Nathalie. Les esters en cosmétologie: généralités et fonctionnalités. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 2004, vol. 11, no 6, p. 454-456.

[105]: MEGAHED, Mohamed G. Preparation of sucrose fatty acid esters as food emulsifiers and evaluation of their surface active and emulsification properties. *Grasas y aceites*, 1999, vol. 50, no 4, p. 280-282.

[106]: https://www.sisterna.com/more-faq-food/vraag-1-food-faq

[107]: PARDON-LABONNELIE, Muriel. Un nouveau regard sur la «tomba del medico» (Morlungo, Vénétie). *Histoire des sciences médicales*, 2014, vol. 48, no 1, p. 107-124.

[108]: PARKER, Florence R. Department of Health and Human Services, US Food and Drug Administration: *Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Sucrose Oligoesters,* 2003. 68 FR 50069.

[109]: BROCHETTE, Pascal. Emulsification. Elaboration et étude des émulsions. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*, 1999, vol. 2, no J2150, p. J2150. 1-J2150. 18.

[110]: DE LUCA, M., ROCHA-FILHO, P., GROSSIORD, J. L., *et al.* Les émulsions multiples. *International journal of cosmetic science*, 1991, vol. 13, no 1, p. 1-21.

[111]: RIDEL, Laure. *Émulsions de Pickering: approche théorique et applications: analyse physico-chimique des phénomènes interfaciaux: obtention d'émulsions de Pickering nanométriques de manière spontanée et d'émulsions foisonnées de Pickering*. 2015. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I.

[112]: VANDEPUTTE, Jacky. Les agro-tensioactifs. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 2012, vol. 19, no 2, p. 133-137

[113]: OKUMURA, Haruo, KITAZAWA, Naoki, WADA,Shoichi, *et al.* Stability of sucrose fatty acid esters under acidic and basic conditions. *Journal of oleo science*, 2011, vol. 60, no 6, p. 313-320.

[114] : SALAGER, Jean-Louis et CHOPLIN, Lionel. Mousses Formation, formulation et propriétés. *Les Techniques de l'Ingenieur*, 2008, no J2200, p. J2200. 1-J2200. 14.

[115] :https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=127246&demande=desc

[116] :https://www.mfc.co.jp/english/physical.htm

[117] :https://www.sisterna.com/more-faq-food/vraag-1-food-faq

[118]: NAGAI, Yukino, KAWANO, Satoko, MOTODA, Kenichiro, *et al.* Solubility testing of sucrose esters of fatty acids in international food additive specifications. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2017, vol. 40, no 3, p. 284-289.

[119]: MATEV, G., PETKOVA, N., VRANCHEVA, R., *et al.* Characterization and application of sucroesters as antimicrobial agents. *University of Plovdiv" Paisii Hilendarski", Scientific Studies–Chemistry*, 2013, p. 1-7.

[120]: TARAHOMJOO, S. et ALEMZADEH, I. Surfactant production by an enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, vol. 33, no 1, p. 33-37.

[121]: THOMAS, L. V., DAVIES, E. A., DELVES-BROUGHTON, J., *et al*. Synergist effect of sucrose fatty acid esters on nisin inhibition of Gram-positive bacteria. *Journal of applied microbiology*, 1998, vol. 85, no 6, p. 1013-1022.

[122]: SHEARER, Adrienne EH, DUNNE, C. Patrick, SIKES, Anthony, *et al*. Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives, and mild heat. *Journal of Food Protection*, 2000, vol. 63, no 11, p. 1503-1510.

[123]: FERRER, Manuel, CRUCES, M. Angeles, BERNABÉ, Manuel, *et al.* Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. *Biotechnology and bioengineering*, 1999, vol. 65, no 1, p. 10-16

[124]: ÖZGÜLSÜN, Aykut, KARAOSMANOGLU, Filiz, et TÜTER, Melek. Esterification reaction of oleic acid with a fusel oil fraction for production of lubricating oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2000, vol. 77, no 1, p. 105-109.

[125]: XIAO, Yong-mei, WU, Qi, CAI, Ying, et al. Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. Carbohydrate Research, 2005, vol. 340, no 13, p. 2097-2103

[126]: Guelai Wissam et Kahia Meriem étude de l'effet du solvant sur le comportement des lipases crl et lpp dans des réactions de trans-esterification 2020 Université SAAD DAHLAB BLIDA Faculté des Sciences

[127]: AFACH, Ghanwa, KAWANAMI, Yasuhiro, et IZUMORI, Ken. Synthesis of D-allose fatty acid esters via lipase-catalyzed regioselective transesterification. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2005, vol. 69, no 4, p. 833-835.

[128]: LIANG, Jintian, ZENG, Wentian, YAO, Pingjia, *et al.* Lipase-catalyzed regioselective synthesis of palmitolyglucose ester in ionic liquids. *Advances in Biological Chemistry*, 2012, vol. 2, no 3, p. 226.

[129]: STEFAN, Poehnlein Martin. Investigations on the Enzymatic Synthesis of Novel Glycolipids. 2014. Thèse de doctorat. Thèse de doctorat

[130]: KHEDER, Fadi. *Production et purification d'acide férulique estérases. Application à la synthèse d'esters phénoliques*. 2007. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.

[131]: YOO, In Sang, PARK, Sang Joon, et YOON, Hyon Hee. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2007, vol. 13, no 1, p. 1-6.

[132]: KLIBANOV, Alexander M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *nature*, 2001, vol. 409, no 6817, p. 241-246.

[133]: SHARMA, Shivika, KANWAR, Shamsher S., et al. Organic solvent tolerant lipases and applications. The Scientific World Journal, 2014, vol. 2014.

[134]: ŠABEDER, Saša, HABULIN, Maja, et KNEZ, Željko. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Food Engineering*, 2006, vol. 77, no 4, p. 880-886.

[135]: OTACHE, Monday Abel, DURU, Remy Ukachukwu, OZIOMA, Achugasim, et al. Catalytic methods for the synthesis of sugar esters. Catalysis in Industry, 2022, vol. 14, no 1, p. 115-130

[136]: LEE, Ki Ppeum et KIM, Hyung Kwoun. Antibacterial effect of fructose laurate synthesized by Candida antarctica B lipase-mediated transesterification. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2016, vol. 26, no 9, p. 1579-1585.

[137]: YAO, Ping-Jia, HUANG, Guang-Jun, YAN, Wei, *et al.* Lipase-catalyzed synthesis and characterization of 6-O-(11-dodecenoic)-glucose ester in ionic liquids. 2012.

[138]: ARCOS, J. A., BERNABE, M., et OTERO, Cristina. Quantitative enzymatic production of 1, 6-diacyl fructofuranoses. Enzyme and microbial technology, 1998, vol. 22, no 1, p. 27-35

[139] :WEI, Q. I. N., HUANG, Yan, YUWEN, D. I. N. G., *et al.* Surfactant distribution in the clouding of TX114. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2008, vol. 16, no 5, p. 722-725.

[140]: CAUGLIA, F. et CANEPA, P. The enzymatic synthesis of glucosylmyristate as a reaction model for general considerations on 'sugar esters' production. *Bioresource Technology*, 2008, vol. 99, no 10, p. 4065-4072.

[141]: GUILLARDEAU, L., MONTET, Didier, KHALED, N., et al. Fructose caprylate biosynthesis in a solvent-free medium. Tenside Surfactants Detergents, 1992, vol. 29, no 5, p. 342-344

[142]: YU, Jiugao, ZHANG, Jianshe, ZHAO, Ang, *et al*. Study of glucose ester synthesis by immobilized lipase from Candida sp. *Catalysis Communications*, 2008, vol. 9, no 6, p. 1369-1374.

[143]:https://www.france-mineraux.fr/nutrition/additifs-alimentaires/e473-sucroesters-dacides-gras/

[144]: BATTAGLIA, Giuseppe, LA RUSSA, M., BRUNO, V., *et al*. Systemically administered D-glucose conjugates of 7-chlorokynurenic acid are centrally available and exert anticonvulsant activity in rodents. *Brain research*, 2000, vol. 860, no 1-2, p. 149-156.

[145]: REDECKER, C., ALTRUP, U., HOPPE, D., et al. Effects of valproate derivatives I.: Antiepileptic efficacy of amides, structural analogs and esters. Neuropharmacology, 2000, vol. 39, no 2, p. 254-266

[146]: LINGOME, Cédric Epoune. Nouveaux agrotensioactifs glycolipidiques: synthèse, propriétés physico-chimiques et application en polymérisation. 2011. Thèse de doctorat. INSA de Lyon

[147]: SHEARER, Adrienne EH, DUNNE, C. Patrick, SIKES, Anthony, et al. Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives, and mild heat. Journal of Food Protection, 2000, vol. 63, no 11, p. 1503-**1510**

[148]: https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Huile-d-olive.html

[149]: EJEDEGBA, B. O., ONYENEKE, E. C., et OVIASOGIE, P. O. Characteristics of lipase isolated from coconut (Cocos nucifera linn) seed under different nutrient treatments. *African Journal of Biotechnology*, 2007, vol. 6, no 6.

[150]: MUTO, Shoshi et BEEVERS, Harry. Lipase activities in castor bean endosperm during germination. *Plant Physiology*, 1974, vol. 54, no 1, p. 23-28.

[151]: ELISA, D., CAVALCANTI, C., MACIEL, Fábio M., *et al.* Acetone powder from dormant seeds of Ricinus communis L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, vol. 137, no 1-12, p. 57.

[152]: HASSANIEN, Fawzi R. et MUKHERJEE, Kumar D. Isolation of lipase from germinating oilseeds for biotechnological processes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1986, vol. 63, no 7, p. 893-897.

[153]: UGUR NIGIZ, F. et DURMAZ HILMIOGLU, N. Rhizomucor miehei lipase-immobilized sodium alginate membrane preparation and usage in a pervaporation biocatalytic membrane reactor. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2016, vol. 30, no 3, p. 381-391.

[154]: EL ALAOUI, Meddy. *Développement de tests enzymatiques applicables au criblage des activités et/ou inhibiteurs de (phospho) lipases*. 2015. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-LyonI.

[155]: Robina R. (2020). Characterization of commercial lipase from indigenous fungal strains and biomass. Thèse de doctorat, university of gujrat

[156]: Gopinath Subash C. B, Periasamy A, Thangavel A, and Azariah H. (2013). Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. BioMed Research International, 154549: 1-10.

[157]: HOMAEI, Ahmad Abolpour, SARIRI, Reyhaneh, VIANELLO, Fabio, *et al.* Enzyme immobilization: an update. *Journal of chemical biology*, 2013, vol. 6, p. 185-205.

[158]: PLOU, F. J., CRUCES, M. A., BERNABE, M., *et al*. Enzymatic synthesis of partially acylated sucroses. 1995.

[159] : https://www.atamanchemicals.com/saccharose_u25890/

[160] : KHALED KHODJA, Nadia, KLEIN, Jean, MAHLER, Bruno, *et al.* *Procédé pour la préparation de sucroesters par réaction d'un sucre et d'un acide gras en milieu solvant et en présence d'une enzyme et sucroesters ainsi préparés*. 1994..

[161] : OLIVE, Gilles, TOREZAN, Gabriela A. Pompeu, et BLECKER, Christophe. Synthèse enzymatique d'esters de fructose. *Comptes Rendus. Chimie*, 2012, vol. 15, no 11-12, p. 1037-1047.

[162] KIM, Chyer, HUNG, Yen-Con, et BRACKETT, Robert E. Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, vol. 61, no 2-3, p. 199-207.

[163] CHAIYASO, Thanongsak, H-KITTIKUN, Aran, et ZIMMERMANN, Wolfgang. Biocatalytic acylation of carbohydrates with fatty acids from palm fatty acid distillates. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2006, vol. 33, no 5, p. 338.

[164] ABDULMALEK, Emilia, SAUPI, Hanim Salami Mohd, TEJO, Bimo A., *et al*. Improved enzymatic galactose oleate ester synthesis in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, vol. 76, p. 37-43.

[165]: https://www.mfc.co.jp/english/owa1570.htm.

[166]: PYO, Sang-Hyun, CHEN, Jiazhi, YE, Ran, *et al.* Sugar esters. In : *Biobased surfactants*. AOCS Press, 2019. p. 325-363.

[167]: OSIPOW, Lloyd, SNELL, Foster Dee, MARRA, Dorothea, *et al*. Surface activity of monoesters fatty acid esters of sucrose. *Industrial & Engineering Chemistry*, 1956, vol. 48, no 9, p. 1462-1464.

[168]: YE, Ran, HAYES, Douglas G., BURTON, Rachel, *et al*. Solvent-free lipase-catalyzed synthesis of technical-grade sugar esters and evaluation of their physicochemical and bioactive properties. *Catalysts*, 2016, vol. 6, no 6, p. 78.

[169] :https://www.alloprof.qc.ca/fr/eleves/bv/sciences/la-solubilite s1018#:~:text=La%20solubilit%C3%A9%20est%20une%20propri%C3%A9t%C3%A9,litre %20(g%2FL)%20.

[170]: HILL JR, C. G., HEDINSDOTTIR, R., et AMUNDSON, C. H. Surface active properties and cleaning efficacy of materials derived from lactitol. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1987, vol. 11, no 2, p. 111-134.

[171]: HUSBAND, F. A., SARNEY, D. B., BARNARD, M. J., *et al*. Comparison of foaming and interfacial properties of pure sucrose monolaurates, dilaurate and commercial preparations. *Food hydrocolloids*, 1998, vol. 12, no 2, p. 237-244.

[172]: https://biochim-agro.univ-lille.fr/lipides/co/Cours_C_6_b_2_c.html

[173]: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167732222015665

[174] https://ressources.unisciel.fr/formulation_cosmetique/co/formulations.html.

[175]: ABDELAZIZ, Shimaa, AHMED, Entsar, SADEK, M., *et al.* A Reliable Solvent-Free Transesterification Synthesis of Carbohydrate Fatty Acid esters: Optimization, Structure-Surface Activity Relationships And Antimicrobial Efficacy. *Egyptian Journal of Chemistry*, 2023, vol. 66, no 3, p. 495-517.

[176]: ARDITTY, Stéphane, SCHMITT, Véronique, GIERMANSKA-KAHN, Joanna, *et al.* Materials based on solid-stabilized emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, vol. 275, no 2, p. 659-664

[177]: SHEN, Ruiling, LUO, Shuangqun, et DONG, Jilin. Application of oat dextrine for fat substitute in mayonnaise. *Food Chemistry*, 2011, vol. 126, no 1, p. 65-71.

[178]: https://patents.google.com/patent/EP0630189B1/fr

[179]: BRIAND, L. (2018). La Chimie du Goût, Article publié par Claire VILAIN, responsable éditoriale du site Culture Sciences-Chimie

[180]: ITAB., SITE WEB. http://www.itab.asso.fr/downloads/colloque-peuv/9_moisseeff.pdf Consulté le 10.06.2019.

[181]: BENGRICHE, Salim et HAFFAF, Amar. Etude de la stabilité d'une émulsion mayonnaise sous Microscope *Cas: CPA Agence 194 Tizi-Ouzou*.Université Mouloud Mammeri.

[182]: ALLOUCHE, Joachim. *Développement de nouvelles méthodes pour l'élaboration d'émulsions multiples eau/huile/eau*. 2003. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.

[183] : https://droguet-sebastien.e-monsite.com/pages/activites-technologiques-terminale-2014-2015/indice-acide-huile-m-.html