

BIOCHEMISTRY AND BIOENGINEERING "NEW APPLICATION OF LIPASES IN LIPID TRANSFORMATION" Enzyme-catalysed enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids of salmon oil: optimisation of reaction conditions

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 8, Numéro 1, 73-7, Janvier - Février 2001, Dossier : Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft - Association française pour l'étude des corps gras

Auteur(s) : Michel LINDER, Jacques FANNI, Michel PARMENTIER, Laboratoire de physico-chimie et génie alimentaires, École nationale supérieure d'agronomie et industries alimentaires (ENSAIA), 54505 Vandœuvre-les-Nancy, France.

Summary : Extraction and concentration of polyunsaturated fatty acid from salmon oil (*Salmo salar*) by enzymatic hydrolysis were studied. Enzymatic aqueous extraction of oil with Neutrase® 0.5I was applied to the salmon flesh in batch reactor. Reaction kinetics were monitored under nitrogen by measuring the degree of hydrolysis (DH%) using the pH-stat method, in order to preserve the functional and nutritional values of hydrolysates. Lipids were separated by centrifugation yielding 14.3% (w/w) for the product, compared to 15.2% (w/w) obtained using the classical method with solvent. Lipase hydrolysis by Novozym® SP 398, a specific sn-1, sn-3 enzyme, and membrane filtration, were evaluated as means of selectively concentrating polyunsaturated fatty acids (PUFA) fractions. A Doehlert matrix was used to study the effect of reaction time, flow and enzyme/protein ratio. Quadratic models were used to generate response surfaces of the liberation of fatty acids during the lipolysis and the composition of major saturated and polyunsaturated fatty acids in the permeate.

Keywords : enzyme hydrolysis, lipid extraction, membrane separation, salmon, fatty acids.

Résumé : L'extraction d'huile de saumon (*Salmo salar*), riche en acides gras poly-insaturés, a été conduite par destructuration ménagée des tissus protéiques à l'aide d'une protéase à large spectre (Neutrase® 0,5 l). Le degré d'hydrolyse a été contrôlé par la méthode du pH-stat en vue de préserver les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des hydrolysats. La récupération des lipides totaux, séparés des hydrolysats par centrifugation, a permis d'atteindre des valeurs (14,3 % de la masse initiale) proches de celles obtenues par extraction chimique (15,2 %). L'huile récupérée par ce procédé a été soumise à l'action d'une lipase stéréospécifique sn-1, sn-3 (Novozym® SP 398). L'hydrolyse a été optimisée par planification expérimentale (réseaux uniformes de Doehlert). Dans une deuxième étape, le mélange réactionnel, soumis à une filtration sur membrane, a conduit à un enrichissement global de 30 % en acides gras poly-insaturés dans le perméat.

Mots-clés : hydrolyse enzymatique, extraction de lipides, séparation sur membrane, saumon, acides gras.

ARTICLE

Renouant avec la tradition des initiatives conjointes DGF¹ et AFECG², le colloque de Würzburg, en octobre dernier, a été l'occasion de présenter les bases de l'European federation for the science and technology of lipids, la future Fédération européenne pour l'étude des corps gras (Eurofedlipid)³.

Près de dix ans après Eurolipides (Angers 1989), le projet d'établissement d'un réseau permanent de chercheurs européens autour des lipides est ainsi relancé sous la forme d'un regroupement des sociétés savantes nationales. Objet de négociations longues et délicates, comme tout ce qui concerne l'Europe, le projet, dans son bien-fondé, n'en est pas moins depuis longtemps établi.

L'expansion du champ des demandes spécifiquement « européennes » adressées à la recherche est une tendance générale au sein de l'UE. En partie liée à la mise en œuvre des politiques communautaires, cette tendance est particulièrement marquée dans le cadre du secteur des graines et huiles végétales, compte tenu des différentes actions qui l'impliquent - politique agricole (volet oléagineux et dossier protéine), politique environnementale, politique de développement durable (énergie, biocarburant), programme cadre pluri-annuel, etc.

De manière convergente, les évolutions du secteur, ces dernières années, faites de concentrations industrielles et d'intensification des échanges (huiles, graines) intra-européens (particulièrement entre la France et l'Allemagne) ont favorisé l'expression d'une demande sociale européenne, dont la sécurité sanitaire et la qualité nutritionnelle des aliments ne sont pas les moindres des composants. Deuxième consommateur mondial de corps gras végétaux - derrière la Chine mais devant les États-Unis - le groupe des pays de l'Union doit traiter et devra traiter dans l'avenir de plus en plus de questions dont la recherche (fondamentale et appliquée) détient largement la clé et touchant en profondeur, comme un passé proche l'a montré, le tissu économique et social.

Réciproquement, la dimension européenne naît des dynamiques internes à la recherche. La nutrition est abordée différemment de part et d'autre de l'Atlantique. Enfin, il est clair que la recherche ne peut rester insensible au débat social et laisser en dehors du champ de sa propre réflexion et de ses analyses la question de l'impact de ses innovations (une prise de conscience plus ou moins avancée selon les disciplines).

Ces enjeux « européens », à la fois généraux et spécifiques, attachés au domaine de l'étude des lipides ouvrent effectivement un champ d'action à la nouvelle fédération, celui d'aider à l'élaboration des interdisciplinarités qu'ils requièrent.

L'acquis de l'AFECG dans cette direction⁴ devrait pouvoir contribuer à la réussite de cet objectif au niveau européen.

Jean-Claude ICART

¹ Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft.

² Association française pour l'étude des corps gras.

³ Voir l'article de Michel PARMENTIER en conclusion du dossier.

⁴ Voir les journées Chevreul de 1999, réunissant technologues, chimistes, biochimistes et cliniciens autour du thème « santé et lipides », *OCL* 2000 ; 7(1).

Illustrations

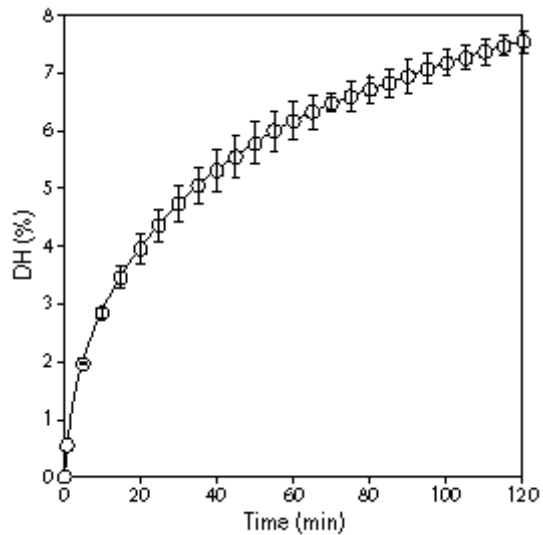


Figure 1. Course of hydrolysis of salmon flesh by Neutrase 0.5; pH 7.0; distilled water [1:1] enzyme: 50g/kg salmon protein.

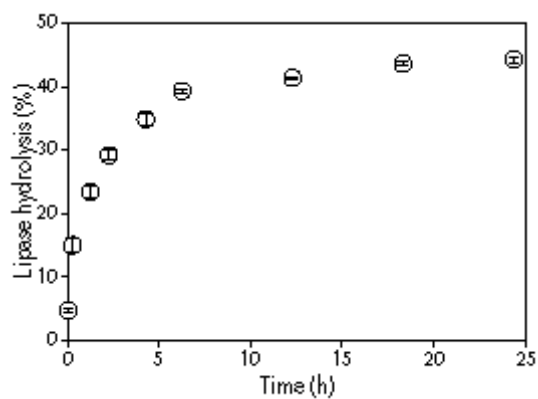


Figure 2. Course of the hydrolysis degree of salmon oil by lipase (37°C, oil/distilled water [1:1]; 40 Kilo Lipase Units).

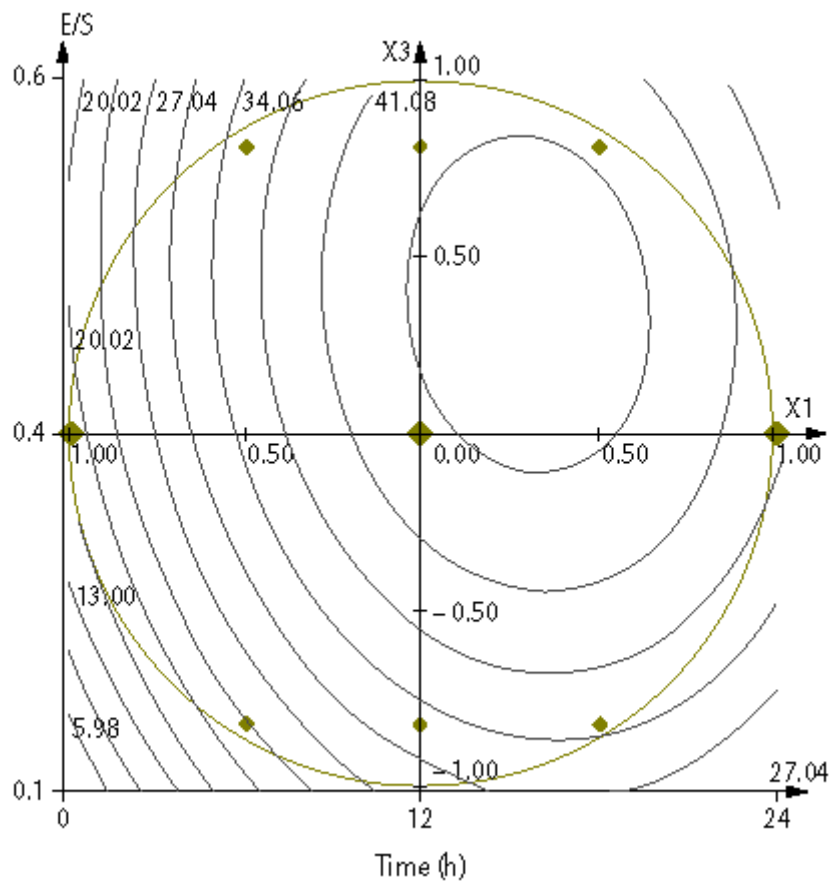


Figure 3. Response surface for the effect of E/S and time on hydrolysis degree (%) of salmon oil treated by lipase SP 398.

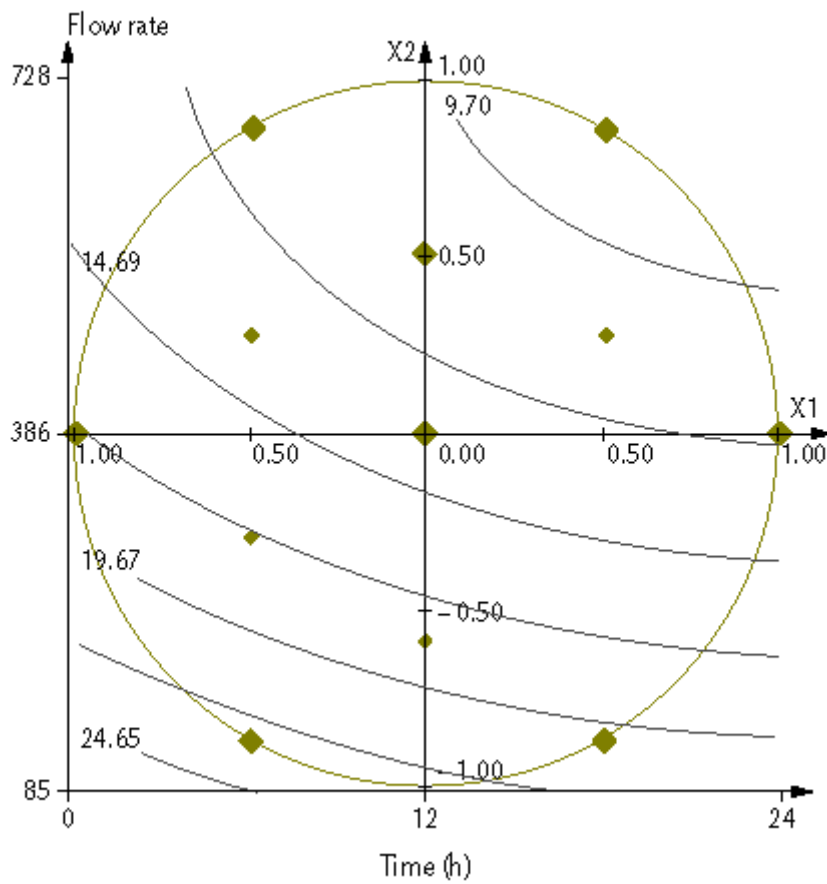


Figure 4. Response surface for the effect of flow rate (g/min) and time on saturated fatty acids amount in the permeate (%) after filtration of salmon oil treated 10 hours by lipase SP 398.

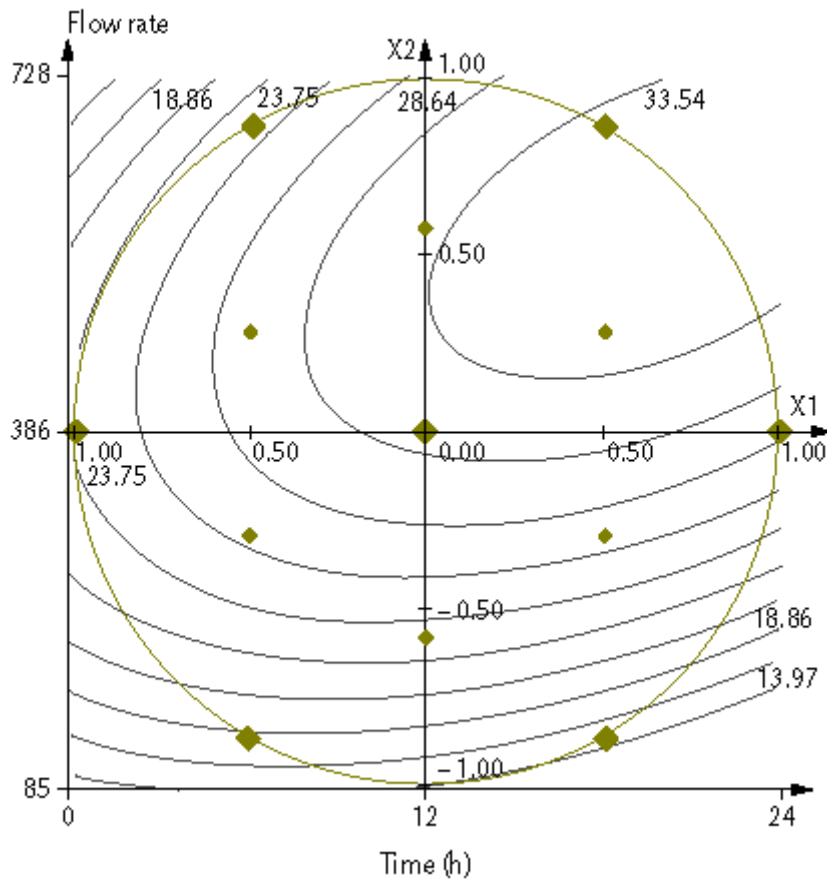


Figure 5. Response surface for the effect of flow rate (g/min) and time (h) on polyunsaturated fatty acids amount in the permeate (%) after filtration of salmon oil treated 10 hours by lipase SP 398.

Table 1. Experimental domain and level distribution of the variables used in the lipase hydrolysis of n-3 polyunsaturated fatty acids of salmon oil.

Independent variables	Symbol	Levels	Experimental values
Reaction time (h)	X1	5	0.25 6.25 12.25 18.25 24.25
Flow rate (g/min)	X2	7	93 197 276 386 486 566 728
Enzyme/substrate	X3	3	0.2 0.4 0.6

Table 2. Doehlert uniform shell design for three variables (X1 reaction time, X2 flow rate and X3 enzyme/substrate) and responses for salmon oil hydrolysis by lipase SP 398.

Run	X1	X2	X3	Responses Y (%)		
				DH	SFA	PUFA
% in mixture during lipolysis						
1	1.0000	0.0000	0.0000	43.20	12.15	27.75
2	-1.0000	0.0000	0.0000	13.00	17.20	25.21
3	0.5000	0.8660	0.0000	43.10	11.42	38.43
4	-0.5000	-0.8660	0.0000	5.98	20.49	11.52
5	0.5000	-0.8660	0.0000	6.84	17.62	12.71
6	-0.5000	0.8660	0.0000	35.70	14.36	24.66
7	0.5000	0.2887	0.8165	43.20	7.21	34.13
8	-0.5000	-0.2887	-0.8165	20.60	14.04	25.85
9	0.5000	-0.2887	-0.8165	26.95	13.09	24.84
10	0.0000	0.5774	-0.8165	31.80	11.26	25.25
11	-0.5000	0.2887	0.8165	38.00	11.95	31.88
12	0.0000	-0.5774	0.8165	30.77	34.62	29.15
13	0.0000	0.0000	0.0000	42.00	14.10	32.51
14	0.0000	0.0000	0.0000	44.60	13.74	31.84
15	0.0000	0.0000	0.0000	44.20	13.00	31.00
16	0.0000	0.0000	0.0000	44.00	13.50	31.50

Degree of hydrolysis: DH; Saturated Fatty Acids: SFA; Polyunsaturated Fatty Acids: PUFA.

Table 3. Regression coefficient of predicted quadratic polynomial models.

Variables	DH (%)	SFA (%)	PUFA (%)
Intercept	43.70***	13.58***	31.71***
Linear			
Time b1	10.02***	-2.70***	2.66**
Flow rate b2	16.86***	-6.62***	8.95***
E/S b3	6.66***	3.14***	3.82***
Quadratic			
b11	-15.60***	1.09	-6.23**
b22	-22.53***	2.82**	-11.43**
b33	-8.18**	1.69*	-0.63
Interaction			
b12	3.77	-0.04	7.26**
b13	-2.04	-2.31*	-0.57
b23	-1.17	-15.46***	0.60
R ²	0.94	0.82	0.87

Table 4. Distribution of the different lipid classes in salmon oil hydrolysed by lipase SP398 (data are reported as uncorrected TLC-FID area percent).

	TG	FFA	1,3-DG	1,2-DG	MG	Polar
Initial	97.7	1.2	0.3	0.5	Nd	0.3
0h15	65.7	13.3	6.6	9.4	3.3	1.7
6h15	61.7	20.4	5.8	4.5	6.1	1.5
12h15	66.7	20.6	4.4	2.7	3.2	2.3
18h15	71.3	20.0	3.7	2.0	2.0	1.1
24h15	66.6	22.4	3.5	2.9	3.8	0.8

Nd: not determined; Triglyceride: TG; Diglyceride: DG; Monoglyceride: MG.

Table 5. Composition of fatty acids from initial salmon oil and composition of the different fractions after lipase hydrolysis.

Fatty acids) (mg/g)	Initial oil	Hydrolysed oil	Permeate (hydrolysed oil)	Retentate (hydrolysed oil)
∑ saturated	249	248	165	332
∑ monoenic	304	310	345	280
∑ n-6	65	65	72.5	58.4
∑ n-3	335	332	366	295
∑ other fatty acids	38	45	52.3	40.2