

Synthèse d'arômes et désacidification d'une huile acide en milieu sans solvant

Synthesizing natural flavours and reducing oil acidity level in a solvent-free system

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 9, Numéro 4, 260-3, Juillet - Août 2002, Fondamental

Auteur(s) : Maha KARRA-CHAABOUNI, Nacim ZOUARI, Olfa FRIKHA, Adel SAYARI, Youssef GARGOURI, Unité de lipolyse enzymatique, ENIS BPW 3038 Sfax-Tunisie.

Author(s) : Maha KARRA-CHAABOUNI, Nacim ZOUARI, Olfa FRIKHA, Adel SAYARI, Youssef GARGOURI

Résumé : La neutralisation partielle de l'huile de grignon a été réalisée par estérification des acides gras libres, catalysé par le lipozyme™ en milieu sans solvant organique et à 40 °C. Le taux d'acidité de cette huile est passé alors de 30 à 13 %. Le même enzyme a été utilisé pour synthétiser des arômes naturels en absence de solvant organique.

Summary : Acid olive oil was partially neutralized using the esterification procedure catalysed by lipozyme™ in a solvent-free system at 40° C. The oil acidity level was reduced from 30 to 13%. Natural flavours were also synthesized, in a system free of organic solvent, using lipozyme™ as a catalyser.

Mots-clés : lipozyme™, désacidification, huile de grignon, estérification, arôme.

Keywords : lipozyme, neutralisation, acid olive oil, esterification, natural flavours

ARTICLE

Avec le développement de l'emploi des enzymes en biotechnologie, de nouvelles molécules complexes, difficiles à obtenir par voie chimique classique, ont été produites par voie enzymatique surtout avec l'orientation vers la biocatalyse en milieu organique peu hydraté dit non conventionnel. Les propriétés (physiques, chimiques, rhéologiques, diététiques...) de ces molécules permettent de les utiliser dans divers domaines, tels que : la cosmétologie, la pharmacologie, l'oléochimie et dans les industries agro-alimentaires. Ces produits portant le label naturel sont de plus en plus recherchés.

Les lipases (triacylglycérol acylhydrolase EC 3.1.1.3) constituent une classe importante d'enzymes possédant un large potentiel d'applications industrielles. Elles sont de plus en plus disponibles grâce à l'amélioration continue des techniques de purification, d'immobilisation et à la connaissance de leurs propriétés biochimiques et structurales. Les micro-organismes constituent une source importante de production de lipases à grande échelle. Plusieurs lipases bactériennes et fongiques ont été purifiées et caractérisées.

Les lipases sont utilisées pour la production de monoglycérides et d'acides gras, employés comme émulsifiants [1], et pour la valorisation de certaines graisses [2, 3]. De plus, elles sont capables de produire des esters d'acides gras, tels que les esters d'alcools terpéniques, qui sont des molécules très recherchées pour leurs propriétés aromatisantes dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques [4, 5].

Parmi les procédés de catalyse non conventionnels utilisés pour la synthèse d'esters par des lipases, on peut citer les milieux à solvants organiques [6], et systèmes micellaires [7]. D'autres systèmes comme l'utilisation de fluide supercritique [8] et la catalyse en phase gazeuse ont été aussi utilisés [9]. Un autre type de procédé utilisé pour la synthèse d'esters, il s'agit de l'estérification en absence de solvant. La réaction est catalysée par la lipase en présence de deux substrats généralement non miscibles. Ce système permet d'éviter les problèmes liés aux solvants organiques [10].

Dans ce travail, nous avons effectué des réactions d'estérification en milieu sans solvant organique, en utilisant une lipase immobilisée de *Mucor miehei* (le lipozyme™). D'abord, nous avons étudié la possibilité de neutraliser une huile très acide par estérification entre acides gras libres et glycérol, cette opération est très importante pour baisser l'acidité. Enfin, nous avons synthétisé des esters d'alcools terpéniques et d'hexanol qui peuvent être utilisés comme arômes dans divers domaines.

Matériel et méthodes

Réactifs

L'acide oléique (Cis-9-octadécénoïque, 97 %) est de Prolabo (France) ; l'acide butyrique (99,5 %), l'acide caproïque (hexanoïque, 98 %), l'acide valérique (98 %), le 1-hexanol (99 %), le géraniol (96 %) et le citronellol (90-95 %) sont de Fluka (Suisse) ; le glycérol (98 %) est de la pharmacie centrale (Tunisie).

Matériel

Le pH-stat est de Metrohm (Suisse) ; l'agitateur (Certomat) est de B. Braun. Biotech. International (Allemagne).

Enzyme

Le lipozyme™ est gracieusement fournie par Novozyme Industry A/S (Danemark). C'est une lipase 1,3 spécifique de *Mucor miehei* immobilisée sur une résine macroporeuse échangeuse d'anions. Elle est fournie avec une teneur en eau comprise entre 5 et 10 % (w/w) et est stable à des températures élevées (80 °C).

Dosage de l'activité lipasique

L'activité lipasique a été mesurée par titrage des AG libres avec NaOH 100 mM à pH 8 et à 37 °C en utilisant un pH-stat. Le test contient 250 µl de tributyrine dans 30 ml de Tris-HCl 2,5 mM [11]. Une unité lipasique correspond à la libération de 1 µmole d'acide gras par minute.

Détermination de l'acidité d'une huile

L'acidité est le pourcentage d'acide gras libre exprimé conventionnellement en milligrammes d'acide oléique libre dans 1 g de corps gras. Elle est dosée selon la norme française NF T60-204 (déc. 68), par une méthode titrimétrique. Les fonctions carboxyliques libres sont titrées à l'aide d'une solution de soude, en présence de phénolphthaléine comme indicateur coloré. Les pourcentages d'esters formés sont déterminés à partir de la mesure de l'acidité.

Détermination de l'indice de peroxyde

L'indice de peroxyde permet d'apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative de l'huile. Par définition, l'indice de peroxyde (Ip) est le nombre de mug d'oxygène actif de peroxyde contenu dans 1 g de corps gras et susceptible d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. Il est dosé selon la norme française NF T60-220 (déc. 68).

Conditions de l'estérification dans un milieu sans solvant

*** Désacidification d'une huile très acide**

La réestérification est réalisée en milieu ouvert, contenant 19,7 g d'huile, 0,644 g de glycérol et l'équivalent de 400 UI de lipozymes, maintenu à 40 °C sous agitation.

*** Synthèse d'arômes**

La synthèse d'esters est effectuée dans un système fermé afin d'empêcher l'évaporation de l'alcool et de l'acide au cours de la réaction. Les réactions sont mises en œuvre en présence de quantité stœchiométriques des deux substrats (17,1 mmoles d'AG et 17,1 mmoles d'alcool). Après homogénéisation, l'équivalent de 400 UI de lipozymes sont ajoutées au milieu réactionnel. Ces milieux sont ensuite incubés sous agitation orbitale à 40 °C et à une vitesse de rotation de 180 rpm. La synthèse est suivie au cours de l'incubation par la détermination du pourcentage de conversion en ester, à partir du dosage de l'acidité. Un contrôle est mesuré en parallèle dans les mêmes conditions et en absence d'enzyme.

Résultats et discussion

Désacidification enzymatique d'une huile très acide

À partir d'une huile très acide (huile de grignon à 30 % d'acidité), nous avons testé la capacité du lipozyme™ à réestérifier les acides gras libres en présence de glycérol.

La *figure 1* représente l'évolution de l'acidité de l'huile de grignon au cours de son incubation en présence de glycérol et de lipozyme™. L'acidité de l'huile diminue de 30 à 13 %, après 50 heures d'incubation. L'addition supplémentaire d'enzyme dans le milieu réactionnel ne permet pas de baisser d'avantage l'acidité de l'huile. Un état d'équilibre de la réaction, dans les conditions décrites, a été probablement atteint. Bhattacharrya *et al.* (1989) [12, 13], ont montré que l'acidité d'une huile de son de riz (30 %) peut être baissée, après réestérification par le lipozyme™ dans un milieu fondu à 70 °C, jusqu'à 3,5 % à condition de travailler sous pression réduite.

Dans notre cas, d'autres facteurs peuvent ralentir ou bloquer la réaction de réestérification. En effet, en milieu ouvert, l'oxygène et la température favorisent l'oxydation des TG. L'oxydation est d'autant plus importante que le taux d'AG libres est élevé. Pour vérifier cette hypothèse, une désacidification de plusieurs huiles présentant différents indices de peroxydes a été étudiée en utilisant le lipozyme™ comme catalyseur. La *figure 2* montre que plus l'indice de peroxyde de l'huile est élevé, plus la désacidification est difficile. La désacidification par estérification est plus efficace quand l'huile est moins oxydée.

Synthèse d'arômes

*** Synthèse d'esters d'hexanol**

L'estérification de l'hexanol avec différents AG (l'acide butyrique, valérique ou caproïque) a été testée en utilisant le lipozyme™ comme catalyseur. Les résultats obtenus sont représentés sur la *figure 3A*.

Les cinétiques de synthèse des esters d'hexanol par le lipozyme™ montrent, qu'à l'équilibre, les pourcentages d'esters formés sont de l'ordre de 60 à 75 %.

Pour étudier l'effet de la longueur de la chaîne d'AG, nous avons estérifié l'hexanol avec l'acide oléique. Le taux d'oléate d'hexyle obtenu est de 80 % après 10 h d'incubation, alors que celui du butyrate d'hexyle est de 20 % pour la même période de réaction. Ce qui suppose que le lipozyme™ catalyse mieux l'estérification d'hexanol en présence d'AG chaînes longues.

Langrand *et al.* [14] ont étudié la synthèse, par différentes lipases, d'esters d'hexanol en présence de solvant organique, en utilisant différents AG chaînes courtes. Ces auteurs ont montré que la lipase non immobilisée de *Mucor miehei* devient plus active en augmentant la longueur de la chaîne de l'AG, alors que la lipase d'*Aspergillus* est plus active avec les AG chaînes courtes.

*** Synthèse d'esters d'alcools terpéniques**

Ces esters sont obtenus par estérification directe entre un alcool terpénique, le géraniol ou le citronellol et l'acide butyrique.

Les résultats obtenus sont portés sur la *figure 3B*, ils montrent que les cinétiques et les pourcentages de butyrate de citronellyle sont similaires à ceux obtenus lors de la synthèse du butyrate de géranyle. Cela est dû au fait que les deux alcools utilisés présentent une structure analogue. Le pourcentage de butyrate de géranyle obtenu est de 52 % après 50 h d'incubation. Le doublement du nombre d'unités lipasiques utilisées, permet d'améliorer le rendement de cette synthèse. On passe alors de 52 à 70 %. Ce résultat suggère que l'enzyme est probablement inhibé par l'eau produite au cours de l'estérification réalisée en milieu fermé.

Pour vérifier l'hypothèse de l'inhibition du lipozyme™ par l'eau formée au cours de l'estérification, des expériences ont été conduites dans les mêmes conditions décrites précédemment mais en ajoutant au préalable dans les milieux réactionnels différentes quantités d'eau. La *figure 4* représente le taux d'ester formé après 120 h d'incubation en fonction du pourcentage d'eau ajoutée. Cette *figure* montre que la capacité de synthèse du lipozyme™ diminue en augmentant la quantité d'eau initiale.

Plusieurs techniques ont été mises au point pour éliminer, en continue, l'eau produite au cours de la réaction de synthèse. La pervaporation sélective sépare l'eau du mélange réactionnel en utilisant une membrane polymérique non poreuse d'acétate de cellulose [14-16]. Lors de la synthèse du n-butyl oléate par le lipozyme™, le pourcentage d'ester obtenu sans l'utilisation de cette technique est de 61,1 % après 140 min, ce taux atteint 92 % en présence de cette membrane [17].

Abréviations

AG : acide gras

BG : butyrate de géranyle

Ip : indice de peroxyde

TG : triglycéride

Rpm : rotation par minute

UI : unité internationale d'activité enzymatique

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons montré que le lipozyme™ est capable de baisser l'acidité de l'huile de grignon de 30 à 13 % à 40 °C. Ces résultats sont comparables à ceux décrits par Ducret *et al.* [18] qui ont baissé l'acidité d'un corps gras reconstitué de 45 à 34 % à 60 °C, en utilisant le lipozyme™ comme catalyseur. Le raffinage des huiles très acide par la lipase peut remplacer l'estérification chimique qui engendre généralement d'autres opérations de raffinage (blanchiment, désodorisation).

Nous avons montré que le lipozyme™ est capable de produire des esters d'hexanol et d'alcools terpéniques utilisés comme arômes dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques. Parmi ces esters on cite le butyrate de géranyle qui est une molécule parfumante caractérisée par une odeur douce fruitée rappelant la pomme verte acide. Ces biomolécules synthétisées sont considérées naturelles, puisqu'elles sont obtenues par voie enzymatique et en système sans solvant organique.

REFERENCES

1. MYRNES B, BARSTAD H, OLSEN RL, ELVEVOLL EO (1995). Solvent-free enzymatic glycerolysis of marine oils. *J Am Oil Chem Soc*, 72 : 1339-44.
2. CHARLEMAGNE D, LEGOY MD (1995). Enzymatic synthesis of polyglycerol-fatty acid esters in a solvent-free system. *J Am Oil Chem Soc*, 72 : 61-5.
3. LÄMSÄ M, HUHTALA A, LINKO YY, LINKO P (1994). 2-ethyl-1-hexanol fatty acid esters from rapeseed oil by transesterification. *Biotechnol Techn*, 8 : 451-6.
4. KARRA-CHAABOUNI M, PULVIN S, TOURAUD D, THOMAS D (1996). Enzymatic synthesis of geraniol esters in a solvent-free system by lipases. *Biotechnol Lett*, 18 : 1083-8.

5. GUBICZA L, KABIRI-BADR A, KEOVES E, BELAFI-BAKO K (2000). Large-scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal. *J Biotechnol*, 84 : 193-6.
6. HARI KRISHNA S, DIVAKAR S, PRAPULLA SG, KARANTH NG (2001). Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *J Biotechnol*, 87 : 193-201.
7. LUISI P, GIOMINI M, PILENI M, ROBINSON M (1988). Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules. *Biochem Biophys Acta*, 947 : 209-46.
8. JACKSON MA, KING JW (1997). Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean oil in supercritical carbon dioxide. *J Am Oil Chem Soc*, 74 : 103-6.
9. BARTON JW, REED EK, DAVISON BH (1997). Gas-phase enzyme catalysis using immobilized lipase for ester production. *Biotechnol Techn*, 11 : 747-50.
10. GOMA-DONCESCU N, LEGOY MD (1997). An original transesterification route for fatty acid ester production from vegetable oils in a solvent-free system. *J Am Oil Chem Soc*, 74 : 1137-43.
11. GARGOURI Y, CUDREY C, MEJDOUB H, VERGER R (1992). Inactivation of human pancreatic lipase by 5-dodzcylidithio-2-nitrobenzoic acid. *Eur J Biochem*, 204 : 1063-7.
12. BHATTACHARYYA S, BHATTACHARYYA DK, CHAKRABORTY AR, SENGUPTA R (1989). Enzymatic deacidification of vegetable oils. *Fat Sci Technol*, 91 : 27-30.
13. BHATTACHARYYA S, BHATTACHARYYA DK (1989). Biorefining of high acid rice bran oil. *J Am Oil Chem Soc*, 66 : 1469-71.
14. LANGRAND G, RONDOT N, TRIANTAPHYLIDES C, BARATTI J (1990). Short chain esters synthesis by microbial lipases. *Biotechnol Lett*, 12 : 581-6.
15. OKAMOTO K, YAMAMOTO M, OTOSHI Y, SEMOTO T, YANO M, TANAKA K, KITA H (1993). Pervaporation-aided esterification of oleic acid. *J Chem Eng Jpn*, 26 : 475-81.
16. MULDER MHV, SMOLDERS CA (1984). On the mechanism of separation of ethanol/water mixtures by pervaporation I. *Calculations of concentration profiles*, 17 : 289-307.
17. KWON SJ, SONG KM, HI HONG W (1995). Removal of water produced from lipase-catalyzed esterification in organic solvent by pervaporation. *Biotechnol Bioeng*, 46 : 393-5.
18. DUCRET A, PINA M, MONTETE D, GRAILLE J (1989). Désacidification enzymatique des huiles hyperacides. *Oléagineux*, 44 : 603-7.

Reçu le 1/9/2001, accepté le 2/2/2002.

Illustrations

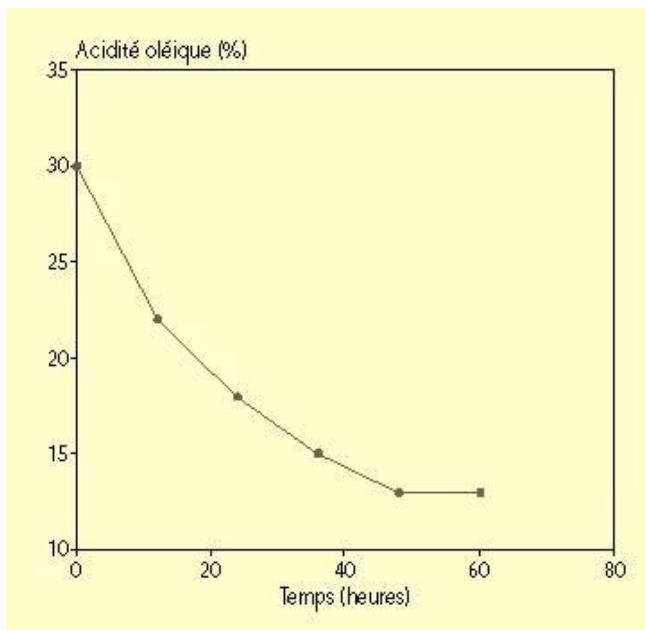


Figure 1. Désacidification enzymatique d'une huile de grignon (acidité initiale 30 %). Le milieu réactionnel contient 19,7 g d'huile, 0,644 g de glycérol et 400 UI de lipozymes. L'incubation a été faite en milieu ouvert à 40 °C et sous agitation (180 rpm).

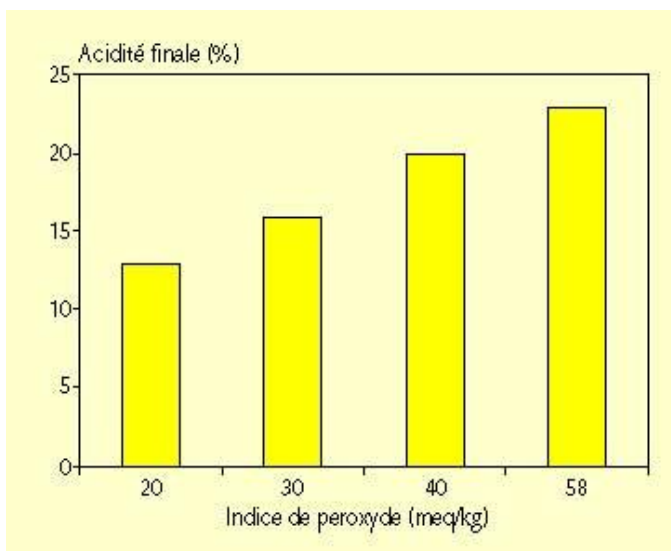


Figure 2. Influence de l'état d'oxydation de l'huile sur le rendement de désacidification. La désacidification de plusieurs huiles ayant différents indices de peroxydes, est faite dans un milieu ouvert contenant 19,7 g d'huile, 0,644 g de glycérol et 400 UI de lipozymes. L'incubation a été faite à 40 °C et sous agitation (180 rpm).

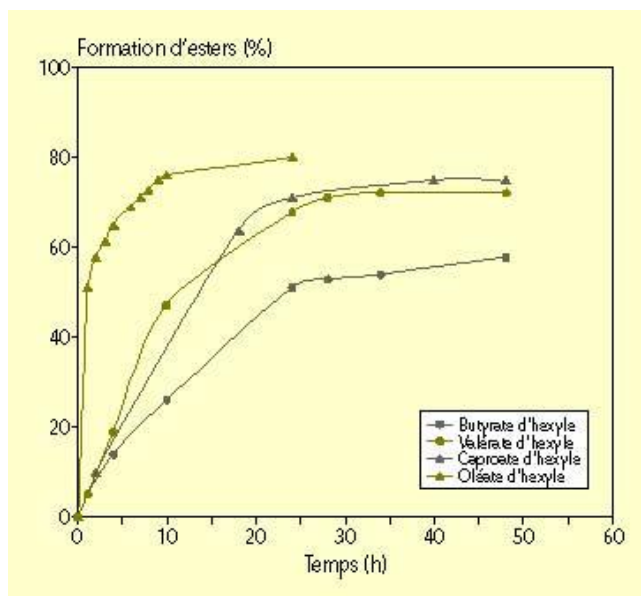


Figure 3. Synthèse d'arômes. **A.** Synthèse d'esters d'hexanol (butyrate d'hexyle, valérate d'hexyle, caproate d'hexyle et oléate d'hexyle). Le milieu contient 17,1 mmoles d'AG, 17,1 mmoles d'hexanol et 400 UI de lipozyme. L'incubation a été faite en milieu fermé à 40 °C et sous agitation (180 rpm).

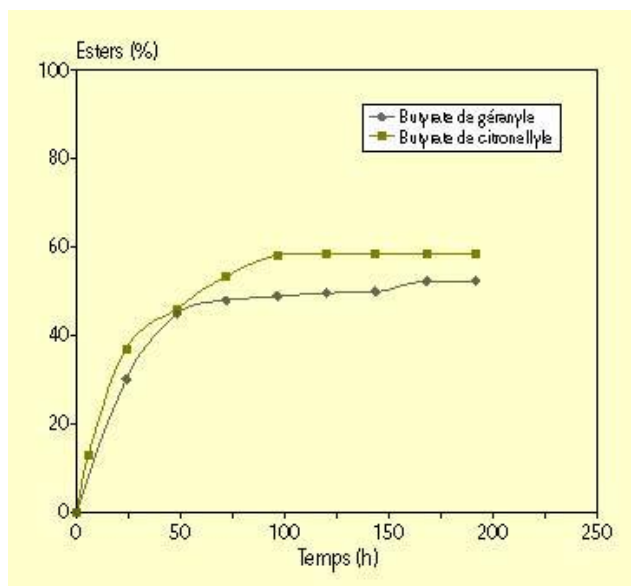


Figure 3. Synthèse d'arômes. **B.** Synthèse du butyrate de géranyle et du butyrate de citronellyle. Le milieu réactionnel contient 17,1 mmoles d'acide butyrique, 17,1 mmoles d'alcool (géraniol ou citronello) et 400 UI de lipozymes. L'incubation a été faite en milieu fermé à 40 °C et sous agitation (180 rpm).

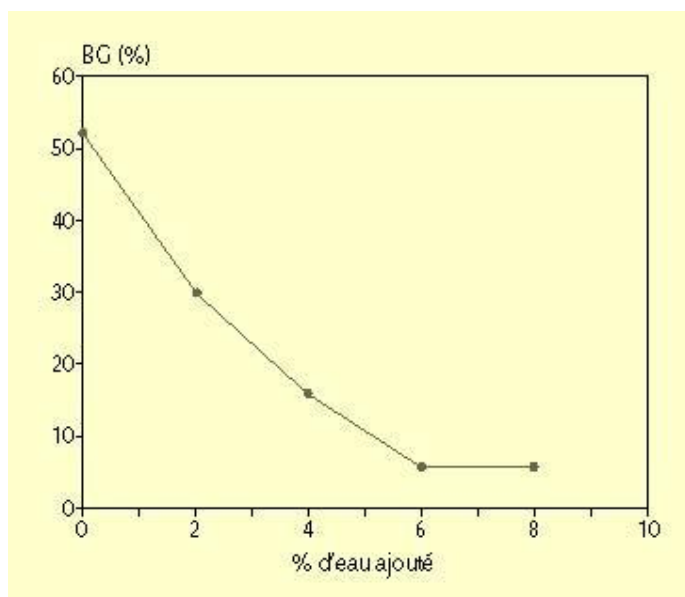


Figure 4. Effet de l'ajout initial d'eau sur le synthèse du butyrate de géranyle après 120 h d'incubation. Le milieu réactionnel contient 17,1 mmoles d'acide butyrique, 17,1 mmoles d'alcool (géraniol ou citronellol) et 400 UI de lipozymes. L'incubation a été faite en milieu fermé à 40 °C et sous agitation (180 rpm).