



**HAL**  
open science

## Valorisation enzymatique des huiles végétales

Etienne Severac

► **To cite this version:**

Etienne Severac. Valorisation enzymatique des huiles végétales. Biologie végétale. INSA de Toulouse, 2010. Français. NNT : 2010ISAT0044 . tel-01559857

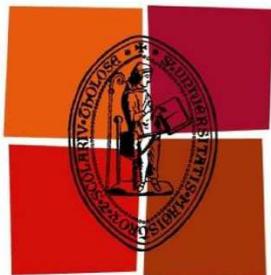
**HAL Id: tel-01559857**

**<https://theses.hal.science/tel-01559857>**

Submitted on 11 Jul 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)

**Discipline ou spécialité :**

Ingénieries microbienne et enzymatique

---

**Présentée et soutenue par :**

**Etienne Séverac**

**Le 21 Octobre 2010**

**Titre :**

**VALORISATION ENZYMATIQUE DES HUILES VEGETALES**

---

**JURY**

Marianne Graber, Professeur, LIENSS, UMR 6250 Université de la Rochelle  
Eric Dubreucq, Professeur, Montpellier SupAgro, Montpellier  
Jean-Stéphane CONDORET, Professeur INP, Toulouse  
Pierre MONSAN, Professeur INSA, Toulouse  
Fabrice TURON, Responsable applications des oléagineux, Syngenta Seeds SAS  
Alain MARTY, Professeur INSA, Toulouse

---

**Ecole doctorale :**

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

**Unité de recherche :**

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

UMR5504, UMR792

**Directeur(s) de Thèse :**

Alain Marty – Professeur, INSA Toulouse

**Rapporteurs :**

Marianne Graber et Eric Dubreucq



thèse  
*présentée devant*  
**L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse**

*en vue de l'obtention du*  
**Doctorat de l'université de toulouse**  
N° d'ordre :

Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries  
Filière : Ingénieries Microbienne et Enzymatique

*par* **Etienne SEVERAC**  
Ingénieur INSA Toulouse

# **VALORISATION ENZYMATIQUE DES HUILES VEGETALES**

*Soutenue le 21 Octobre 2010 devant la commission d'examen :*

Marianne Graber	Professeur, LIENSS, UMR 6250 Université de la Rochelle
Eric Dubreucq	Professeur, Montpellier SupAgro, Montpellier
Jean-Stéphane CONDORET	Professeur INP, Toulouse
Pierre MONSAN	Professeur INSA, Toulouse
Fabrice TURON	Responsable applications des oléagineux, Syngenta Seeds SAS, Toulouse.
Alain MARTY	Professeur INSA, Toulouse

Cette thèse a été préparée au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (UMR CNRS 5504, UMR INRA 792) de l'INSA de Toulouse en convention CIFRE avec Syngenta Seeds SAS, dans le cadre de l'école doctorale SEVAB.



**Nom :** SEVERAC

**Prénom :** Etienne

**Titre :** Valorisation enzymatique d'huiles végétales.

**Spécialité :** Ingénierie Microbienne et Enzymatique

**Directeur de thèse :** Pr. Alain Marty

**Année :** 2010 (21 Octobre)

**Lieu :** Toulouse

**N° d'ordre :**

**Pages :** 355

---

**RESUME :**

Cette étude a porté sur le développement de procédés continus performants de production d'esters à partir de l'huile de tournesol hautement oléique vierge ou raffinée en réacteurs enzymatiques à lit fixe, très productifs et stables dans le temps.

Un procédé de transestérification continue en réacteur à lit fixe utilisant Novozyme 435 (lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur Lewatit VP OC 1600), biocatalyseur non régio-spécifique, a été optimisé pour transformer de l'huile vierge de tournesol hautement oléique en esters butyliques. Les phénomènes de partition des composés polaires (phospholipides présents initialement dans l'huile, du glycérol co-produits etc.) entre milieu réactionnel et support enzymatique ont été gérés grâce à l'utilisation de *tert*-butanol, un solvant polaire. Les conditions assurant le meilleur compromis entre stabilité, productivité et rendements de production d'esters ont été obtenues pour une concentration initiale en huile de 500mM et un rapport molaire entre substrats de 5. De telles conditions permettent une productivité de 13,8 tonnes.an<sup>-1</sup>.kg de Novozyme 435<sup>-1</sup>. Le réacteur ainsi dimensionné s'est avéré stable pendant 50 jours consécutifs sans aucune perte d'activité, permettant de minimiser le coût élevé de l'enzyme. L'originalité du procédé est l'utilisation d'huiles vierges contenant des antioxydants naturels (phospholipides, tocophérols etc.). Nous avons démontré que ces composés mineurs sont préservés au cours du procédé de transestérification. Cela confère aux esters formés de remarquables propriétés de résistances à l'oxydation.

La pertinence économique du procédé a été améliorée grâce au développement d'un nouveau biocatalyseur sur support hydrophobe (l'Accurel MP) permettant d'éviter toute adsorption de composés polaires. Une analyse économique du procédé (maximisation de la valeur nette actualisée) a permis de rationaliser les conditions optimales d'immobilisation. Une économie de l'ordre de 50% sur les coûts générés tout au long du temps de vie du procédé a pu ainsi être obtenue. En conditions de transestérification continue, aucune différence dans le profil de produits par rapport à Novozyme 435 n'a été observée.

Finalement, une alternative à la transestérification directe de l'huile a été envisagée. Une première phase d'hydrolyse de l'huile est suivie d'un procédé de récupération des acides gras qui sont dans un second temps estérifiés enzymatiquement. Pour réaliser cette dernière étape, le meilleur système réactionnel s'est avéré être le milieu sans solvant. Un réacteur continu d'estérification de l'acide oléique avec l'*isobutanol* a été optimisé. Cela a permis un réacteur stable pendant 54 jours consécutifs et respectant les critères des biotechnologies blanches. Une productivité annuelle de 126 tonnes.kg de Novozyme 435<sup>-1</sup> a été atteinte. Cela représente une amélioration de la productivité d'un facteur 9,2 par rapport au procédé de transestérification développée précédemment.

**Mots clés :** lipases, huiles végétales, esters d'acides gras, transestérification, estérification, réacteur à lit fixe, stabilité opérationnelle, productivité, stabilité oxydative.

---

**JURY :**

Marianne GRABER, Professeur, Université de la Rochelle / Rapporteur

Eric DUBREUCQ, Professeur, Montpellier SupAgro / Rapporteur

Pierre MONSAN, Professeur INSA, Toulouse / Président

Jean Stéphane CONDORET, Professeur INP, Toulouse / Examineur

Fabrice TURON, Syngenta Seeds SAS, Toulouse / Responsable industriel

Alain MARTY, Professeur INSA, Toulouse / directeur de thèse.

---

Soutenu le 21 Octobre 2010 à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

**Ecole Doctorale:** SEVAB (Ecological, Veterinary and Agronomic Sciences and Bioengineering)

**Laboratoire** Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés UMR5504 CNRS/INSA, UMR792  
INRA/INSA. Convention 'Cifre' avec Syngenta Seeds SAS



**Name :** SEVERAC

**First name :** Etienne

**Title :** Valorisation enzymatique d'huiles végétales.

Speciality: Microbial and enzymatic engineering

Supervisor: Pr. Alain Marty

Year: 2010 (October 21<sup>st</sup>)

Place: Toulouse

Order n°:

Pages: 355

---

**ABSTRACT:**

This work focused on the development of efficient continuous processes for the production of esters from crude or refined high oleic sunflower oil with enzymatic packed bed reactor presenting high levels of productivity and stability.

A process of continuous transesterification in packed bed reactor using Novozyme 435 (lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto Lewatit VP OC 1600), a non-specific biocatalyst, was optimized to transformation of high-oleic sunflower oil into butylic esters. The phenomena of partition of polar compounds (phospholipids found in crude oils, produced glycerol etc.) between the reaction medium and the enzymatic support were managed using *tert*-butanol, a polar solvent. The conditions that enabled the best compromise between stability, productivity and production yields were obtained with an initial oil concentration of 500 mM and a molar ratio between co-substrates of 5. Such conditions enabled a productivity of 13.8 tons.kg<sup>-1</sup>.kg of Novozyme 435<sup>-1</sup> to be reached. The reactor exhibited great stability for 50 consecutive days without any loss of activity. That enabled to minimize the high costs of the enzyme. The novelty of the process was the use of crude oils, containing high levels of natural antioxidants (phospholipids, tocopherols etc.). We demonstrated that these minor components of oils were preserved during the transesterification process. It conferred the synthesized esters some remarkable properties of oxidative resistance.

The economic relevance of the process was improved thanks to the development of a new biocatalyst onto a very hydrophobic support (Accurel MP) in order to avoid any adsorptions of polar compounds. An economic analysis (maximisation of the net present value) enabled to rationalize the optimal immobilisation conditions. Over the whole process, it enabled a 50% saving on the global expenses. In continuous transesterification conditions, no difference in the product profile was noticed between the new biocatalyst and Novozyme 435.

Finally, an alternative to direct transesterification of oil was considered. A first stage of oil hydrolysis is followed by a process of fatty acid recovery and a stage of enzymatic esterification into esters. In order to realize/complete this last stage, the best reaction system was a solvent-free medium. A continuous reactor for the esterification of oleic acid with *isobutanol* was optimized. It enabled a reactor stable/a stable reactor for 54 consecutive days, respecting the conditions of white biotechnologies. An annual productivity of 126 tons.year<sup>-1</sup>.kg of Novozyme 435<sup>-1</sup> was reached. That represented a productivity improvement by a factor of 9.2 in comparison with the transesterification process.

**Key words :** lipases, vegetable oils, fatty acid alkyl esters, transesterification, esterification, packed bed reactor, operational stability, productivity, oxidative stability, economic pertinence/relevance.

---

**JURY :**

Marianne GRABER, Professeur, Université de la Rochelle / Rapporteur

Eric DUBREUCQ, Professeur, Montpellier SupAgro / Rapporteur

Jean Stéphane CONDORET, Professeur INP, Toulouse/ Examineur

Pierre MONSAN, Professeur INSA, Toulouse / President

Fabrice TURON, Syngenta Seeds SAS, Toulouse /

Alain MARTY, Professeur INSA, Toulouse / PhD Director

---

Defense planned October, the 21<sup>st</sup> 2010 at National Institute of Applied Sciences in Toulouse

**Doctorate school:** SEVAB (Ecological, Veterinary and Agronomic Sciences and Bioengineering)

**Laboratory:** Laboratory for Biosystems and Chemical Engineering UMR5504 CNRS/INSA, UMR792 INRA/INSA.

Sponsored by Syngenta Seeds SAS.



## **Publications**

### **I. Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil.**

**Etienne Séverac**, Olivier Galy, Fabrice Turon, Pierre Monsan et Alain Marty. 2011.  
*Bioresource technology*, 102(8), 4954-4961. (impact factor : 4,253)

### **II. Continuous lipase-catalyzed transesterification of crude vegetable oils: a way to improve oxidative stability of fatty acid alkyl esters.**

**Etienne Séverac**, Julien Cescut, Fabrice Turon, Pierre Monsan and Alain Marty.

*Soumis dans Journal of the American Oil Chemists' Society* (impact factor: 1,803)

### **III. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact.**

**Etienne Séverac**, Olivier Galy, Fabrice Turon, Catherine Azzaro Pantel, Jean-Stéphane Condoret, Pierre Monsan et Alain Marty. 2011. *Enzyme and microbial technology*, 48(1), 61-70. (Impact factor: 2,638)

### **IV. Bio-kerosene production by continuous lipase-catalyzed esterification of fatty acids from Single cell oil.**

Olivier Galy, **Etienne Séverac**, Yohann Allouche, Pierre Monsan & Alain Marty.

*En préparation*

# REMERCIEMENTS

# **MERCI !**

A l'heure où j'écris ces remerciements, beaucoup de m<sup>3</sup> sont passés sous les ponts et tant de montagnes à gravir se sont dressées pour me retarder dans le dépôt de ce manuscrit. Malgré tout, les sentiments de gratitude envers toutes les personnes qui ont participé de loin ou de près à ces travaux sont encore bien présents dans ma tête. Les voici....

En tout premier lieu, je remercie chaleureusement Thierry Véronese et Pierre Monsan sans lesquels ce projet de doctorat en convention CIFRE n'aurait pas vu le jour. Je remercie par la même occasion la société SYNGENTA SEEDS SAS pour avoir financé l'ensemble de ces travaux.

J'adresse mes chaleureux remerciements au Professeur Alain Marty pour avoir dirigé ces travaux mais surtout pour toutes ces années de collaboration dans tous ces différents projets. Alain, Merci pour ton soutien et ton expertise apportée à cette thèse. Merci pour toutes nos discussions scientifiques ou pas ...

Mes chaleureux remerciements également à Fabrice Turon, mon responsable industriel, pour son soutien tout au long de ces travaux, même lorsque les eaux étaient agitées. Je te suis aussi très reconnaissant pour la suite des évènements. Sacrée aventure, quoi qu'on en dise !

Je remercie Marianne Graber et Eric Dubreucq pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, pour l'attention qu'ils y ont portée et la qualité de leurs critiques très constructives.

Je continue en remerciant Jean Christophe Condoret et Catherine Azzaro Pantel du Laboratoire de Génie Chimique de l'INP/ENSIACET avec qui nous avons eu une très sympathique et enrichissante collaboration.

Je ne saurais trop te remercier Magali (Rault) d'avoir sauvé la validité de mon jury de thèse à la dernière minute. Tu venais assister à une soutenance et te voilà à la table de jury avec 20 minutes pour feuilleter le manuscrit ! Dans tous les cas, je suis très fier d'avoir été ton tout premier jury.

Meric bien entendu à tous mes Lab-Mate : Flo B., Sophie D., Miguel Angl C., Valérie D., Oliv', Yoann B., Vince L., Sandra P., Nelly M., Etienne W., Mélu, Steph Emond dit Google, Manue, Emeline, Elise, Ana, Ann, Gaétan, David G., Sandrine, Péco, Régis, Fernando, Seb et tous ceux que j'oublie, vous êtes bien trop nombreux. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble. Je suis très content d'avoir croisé vos routes.

Un Merci très spécial à Mag (Remaud) pour ta confiance de toujours...

Ma famille, mes amis.

Enfin, un grand merci à toi Laurence pour ton soutien sans faille, pendant cette thèse mais aussi et surtout après. On en a vécu des trucs !

Ma plus belle fierté de ce temps de doctorat ?

Bastien.



# SOMMAIRE

<b>Remerciements .....</b>	<b>9</b>
<b>Sommaire .....</b>	<b>13</b>
<b>Index Des Figures .....</b>	<b>20</b>
<b>Index Des Tables.....</b>	<b>27</b>
<b>Index Des Abréviations.....</b>	<b>31</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>35</b>
<b>I :    Etat de l'Art. ....</b>	<b>39</b>
I.1    Vers un développement durable.....	40
I.1.1    Historique, enjeux et objectifs du développement durable.....	40
I.1.2    La Chimie verte.....	45
I.1.3    Le contexte réglementaire.....	49
I.1.3.1    Au niveau national : le ‘Grenelle Environnement’.....	49
I.1.3.2    Au niveau européen : Le règlement REACH.....	50
I.1.3.3    Au niveau mondial : Le protocole de Kyoto.....	52
I.1.4    Outils de management environnemental.....	53
I.1.4.1    L'analyse du cycle de vie.....	53
I.1.4.2    L'analyse d'éco-efficience.....	55
I.1.4.3    L'initiative ‘Responsible care’.....	55
I.2    Les huiles végétales, sources de carbone renouvelable.....	56
I.2.1    Généralités.....	56
I.2.2    Les principaux constituants des huiles végétales.....	58
I.2.2.1    Triglycérides et composition en acides gras.....	58
I.2.2.2    Les composants mineurs.....	62
I.2.3    Raffinage des huiles.....	73
I.2.3.1    Le raffinage chimique.....	74
I.2.3.2    Raffinage physique.....	78
I.2.4    Mécanisme d'oxydation des huiles et matières grasses.....	79
I.2.4.1    Le mécanisme d'auto-oxydation des huiles.....	81
I.2.4.2    L'oxydation photosensible.....	83
I.2.4.3    Les Antioxydants.....	85

I.3	Les esters d'acides gras.....	90
I.3.1	<i>Les Marchés cibles.....</i>	90
I.3.1.1	<i>Les biodiesels.....</i>	91
I.3.1.2	<i>Les biolubrifiants.....</i>	93
I.3.1.3	<i>Les biosolvants.....</i>	96
I.3.2	<i>Propriétés essentielles des esters d'acides gras.....</i>	97
I.3.2.1	<i>Le nombre de cétanes (propre aux biodiesels).....</i>	98
I.3.2.2	<i>Le point d'éclair.....</i>	98
I.3.2.3	<i>Les propriétés d'écoulement à basse température.....</i>	99
I.3.2.4	<i>Viscosité et index de viscosité.....</i>	99
I.3.2.5	<i>Résistance à l'oxydation.....</i>	100
I.3.3	<i>Influence de la composition des esters sur les propriétés physico-chimiques des esters d'alkyle.</i> 102	
I.3.3.1	<i>Effet sur le nombre de cétanes.....</i>	103
I.3.3.2	<i>Effet sur le point de fusion.....</i>	104
I.3.3.3	<i>Effet sur la viscosité.....</i>	108
I.3.3.4	<i>Effet sur la stabilité oxydative.....</i>	111
I.4	La biocatalyse au profit de la chimie verte.....	112
I.4.1	<i>Biotechnologies blanches et biocatalyse.....</i>	112
I.4.2	<i>Enzymes et milieux organiques.....</i>	116
I.5	Les lipases.....	117
I.5.1	<i>Réactions catalysées par les lipases.....</i>	117
I.5.2	<i>Éléments de structure.....</i>	120
I.5.2.1	<i>Le repliement <math>\alpha/\beta</math>.....</i>	120
I.5.2.2	<i>Les résidus catalytiques des lipases.....</i>	121
I.5.2.3	<i>Le volet amphiphile.....</i>	122
I.5.2.4	<i>Le trou oxyanion.....</i>	123
I.5.3	<i>Mécanisme catalytique.....</i>	125
I.5.3.1	<i>L'étape d'acylation.....</i>	126
I.5.3.2	<i>L'étape de désacylation.....</i>	126
I.5.4	<i>Classification des lipases.....</i>	127
I.5.5	<i>Les spécificités des lipases.....</i>	129

I.5.5.1	<i>La typosélectivité</i> .....	131
I.5.5.2	<i>La régiosélectivité</i> .....	134
I.5.5.3	<i>L'énantiosélectivité</i> .....	139
I.5.6	<i>Mise en œuvre des lipases pour la synthèse d'esters d'acides gras</i> .....	142
I.5.6.1	<i>Immobilisation des lipases</i> .....	142
I.5.6.2	<i>Phénomènes de partage</i> .....	149
I.6	<b>Synthèse d'esters à partir d'huiles végétales par les lipases</b> .....	157
I.6.1	<i>Mécanisme réactionnel</i> .....	157
I.6.2	<i>Migration d'acyle</i> .....	160
I.6.3	<i>Alcoolyse enzymatique des huiles</i> .....	164
I.6.3.1	<i>Généralités</i> .....	164
I.6.3.2	<i>Solvant et activité enzymatique</i> .....	171
I.6.3.3	<i>Influence du milieu sur la position d'équilibre réactionnel</i> .....	172
I.6.3.4	<i>Gestion des composés polaires</i> .....	175
I.6.4	<i>Alcoolyse enzymatique des huiles vierges</i> .....	181
I.6.5	<i>Autres stratégies de production enzymatique d'esters d'acides gras à partir des huiles</i> .....	182
I.6.5.1	<i>Interestérisation des huiles avec des esters d'alkyle</i> .....	182
I.6.5.2	<i>Interestérisation des huiles avec des carbonates d'alkyle</i> .....	184
I.6.6	<i>Procédés continus de production d'esters d'acides gras à partir d'huile</i> .....	186
I.7	<b>Références Bibliographiques</b> .....	191
<b>II :</b>	<b>Publication n°1 : Production continue d'esters d'acides gras à partir d'huile de tournesol hautement oléique catalysée par les lipases</b> .....	<b>214</b>
II.1	<b>Résumé</b> .....	216
II.2	<b>Abstract</b> .....	220
II.3	<b>Introduction</b> .....	221
II.4	<b>Material and Methods</b> .....	224
II.4.1	<i>Materials</i> .....	224
II.4.2	<i>Batch reactions</i> .....	225
II.4.3	<i>Continuous reaction</i> .....	225
II.4.4	<i>Analytical methods</i> .....	226
II.5	<b>Results and Discussion</b> .....	227
II.5.1	<i>Lipase screening in batch reactions</i> .....	228

II.5.2	<i>Crude oil vs refined oil.....</i>	233
II.5.3	<i>Effect of the butanol/TAG molar ratio in continuous packed bed reactor. ....</i>	235
II.5.4	<i>Effect of initial TAG concentration in continuous PBR. ....</i>	237
II.5.4.1	<i>Effect of initial TAG concentration on final product mixture. ....</i>	237
II.5.4.2	<i>Effect of initial TAG concentration on productivity.....</i>	239
II.5.5	<i>Reactor stability. ....</i>	242
II.6	Conclusions .....	243
II.7	References .....	244
<b>III :</b>	<b>Publication n°2 : Transestérification continue des huiles végétales brutes : une voie pour améliorer la stabilité oxydative des esters.....</b>	<b>248</b>
III.1	Résumé.....	250
III.2	Abstract .....	254
III.3	Introduction. ....	255
III.4	Materials and Methods. ....	258
III.4.1	<i>Materials .....</i>	258
III.4.2	<i>Continuous transesterification in a packed bed reactor.....</i>	259
III.4.3	<i>HPLC analysis. ....</i>	259
III.4.4	<i>Quantification of fatty acids in oils. ....</i>	259
III.4.5	<i>Minor component and oxidative stability analysis. ....</i>	260
III.5	Results and Discussion.....	261
III.5.1	<i>Production of FAAE from crude and refined oils.....</i>	261
III.5.2	<i>Influence of transesterification process on phospholipid content. ....</i>	262
III.5.3	<i>Influence of transesterification process on tocopherol and sterol contents. ....</i>	264
III.5.4	<i>Influence of transesterification process on phenolic compound content.....</i>	269
III.5.5	<i>Oxidative stability of FAAE.....</i>	270
III.6	Conclusion.....	273
III.7	References .....	274
<b>IV :</b>	<b>Publication n°3 : Selection de la méthode d'immobilisation de CalB pour catalyser la transestérification continue d'huiles végétales: analyse de l'impact économique. ....</b>	<b>278</b>
IV.1	Résumé.....	280
IV.2	Abstract .....	284
IV.3	Glossary.....	285
IV.4	Introduction .....	287

IV.5	Material and Methods.....	290
IV.5.1	Materials .....	290
IV.5.2	Glycerol and butanol adsorption on enzymatic support. ....	290
IV.5.3	Enzyme immobilisation on Accurel MP .....	291
IV.5.4	Assay of free lipase activity.....	292
IV.5.5	Assay of immobilized lipase activity.....	292
IV.5.6	Analytical methods.....	293
IV.6	Results and Discussion.....	293
IV.6.1	Choice of the enzyme support.....	293
IV.6.2	Optimization of CalB immobilization on Accurel MP.....	297
IV.6.3	Enzyme cost analysis.....	302
IV.6.4	Reactor design.....	305
IV.6.5	Reactor cost Estimation .....	307
IV.6.5.1	General methodology of capital cost estimate : Chauvel et al. <sup>[52]</sup> , Peters & Timmerhaus <sup>[51]</sup> .....	308
IV.6.5.2	Methodology described by Turton et al. <sup>[50]</sup> .....	309
IV.6.5.3	Average capital cost estimate .....	310
IV.6.6	Net present value.....	312
IV.6.7	Conclusion .....	315
IV.6.8	References .....	316
<b>V :</b>	<b>Publication n°4: Production continue de bio-kerozene par esterification enzymatique des huiles produits par les microorganismes. ....</b>	<b>322</b>
V.1	Résumé.....	324
V.2	Abstract. ....	328
V.3	Introduction .....	329
V.4	Material and methods .....	332
V.4.1	Material.....	332
V.4.2	Batch reactions.....	332
V.4.3	Continuous reaction in packed bed reactor .....	332
V.4.4	Medium dehydration .....	333
V.4.5	Analytical method.....	334
V.4.6	Water activity and water concentration measurement .....	334
V.5	Results and Discussion.....	334
V.5.1	Choice of solvent.....	334
V.5.1.1	The Modelling approach.....	335

V.5.1.2	<i>Experimental comparison of solvent</i> .....	343
V.5.2	<i>Development of an optimal continuous plug flow reactor</i> .....	344
V.5.3	<i>Process optimisation</i> .....	347
V.5.4	<i>Versatility of the developed enzymatic process</i> .....	347
V.6	<b>Conclusion</b> .....	350
	<b>Acknowledgements</b> .....	<b>350</b>
V.7	<b>References</b> .....	351
<b>VI :</b>	<b>Conclusion Générale</b> .....	<b>354</b>

## INDEX DES FIGURES

Figure I.1-1: Schéma du développement durable : à la confluence des trois piliers du développement durable <sup>[3]</sup> .....	42
Figure I.1-2 : Schéma de la hiérarchisation de la minimisation des déchets <sup>[4]</sup> .....	43
Figure I.1-3 : Calendrier d'enregistrement du Règlement REACH <sup>[15]</sup> .....	51
Figure I.1-4 : Diagramme des 4 étapes d'analyse du cycle de vie <sup>[18]</sup> .....	54
Figure I.2-1 : Production mondiale (x10 <sup>6</sup> tonnes) d'huiles végétales selon les continents entre 1990 et 2007 <sup>[23]</sup> .....	57
Figure I.2-2 : Représentation schématique d'un triacylglycérol, portant un résidu d'acide oléique (C18 :1 <sup>Δ9</sup> ) en position 1, un résidu d'acide linoléique (C18 :2 <sup>Δ9,12</sup> ) en position 2 et un résidu d'acide linoléique (C18 :3 <sup>Δ9,12,15</sup> ) en position 3.....	58
Figure I.2-3 : Représentation schématique de la formule générale des phosphoglycérides. ...	62
Figure I.2-4 : Représentation schématique de la formule générale de la sphingomyéline.....	63
Figure I.2-5 : Structure des Tocophérols et Tocotriénols.....	64
Figure I.2-6 : représentation du noyau cyclopentanophénanthrène, motif de base des stérols.	65
Figure I.2-7 : Représentation schématique de phytostérols courants.....	66
Figure I.2-8 : Teneur en stérols totaux (mg/100g) de quelques huiles d'intérêt industriel <sup>[32]</sup> ..	67
Figure I.2-9 : Comparaison entre la teneur en stérols libres (mg/100g) (violet) et la teneur en stérols estérifiés (vert) de quelques huiles d'intérêt industriel <sup>[32]</sup> .....	68
Figure I.2-10 : Représentation schématique des structures de polyphénols présents dans les huiles végétales. ....	71
Figure I.2-11 : Diagramme des opérations élémentaires du raffinage chimique des huiles végétales <sup>[45]</sup> .....	75
Figure I.2-12 : Orbitales moléculaires des oxygènes à triplet <sup>3</sup> O <sub>2</sub> et à singulet <sup>1</sup> O <sub>2</sub> <sup>[34, 48]</sup> .....	80
Figure I.2-13 : Energie nécessaire pour la formation d'un radical lipidique selon la position de l'hydrogène sur la chaîne carbonée de l'acide linoléique <sup>[34]</sup> .....	82
Figure I.2-14: mécanisme chimique de la formation de l'oxygène à singulet en présence de sensibilisateur, de lumière et d'oxygène à triplet <sup>[48]</sup> .....	83
Figure I.2-15: formation du sensibilisateur excité à triplet ( <sup>3</sup> sen*) et ses réactions avec les substrats selon des réactions de type I ou de type II <sup>[48]</sup> .....	84
Figure I.2-16 : Stabilisation par résonance d'un radical antioxydant <sup>[34]</sup> .....	86
Figure I.3-1: Evolution de la production de biocarburants dans le monde (en millions de tonnes). <sup>[61]</sup> .....	91
Figure I.3-2: Production (A) et Capacités de production (B) européennes (violet) et mondiales (vert) de biodiesel depuis 2002 <sup>[62]</sup> .....	93

Figure I.3-3: Segmentation du marché européen des lubrifiants <sup>[64]</sup> .....	94
Figure I.3-4: Segmentation du marché européen des biolubrifiants <sup>[64]</sup> .....	95
Figure I.3-5 : Répartition des marchés des solvants en 2000 en Europe selon les secteurs d'application <sup>[67]</sup> .....	97
Figure I.3-6 : Corrélation entre nombre de cétane et nombre de carbone d'esters méthyliques. Influence des doubles liaisons <sup>[77]</sup> .....	103
Figure I.3-7: Points de fusion (°C) d'esters méthyliques d'acides gras saturés linéaires <sup>[74]</sup> ..	105
Figure I.3-8: Températures de fusion (°C) d'esters méthyliques (□) <i>cis</i> mono-insaturés ω-9 de longueur de chaîne carbonée croissante, comparées aux esters méthyliques saturés équivalents (◇) <sup>[74]</sup> .....	106
Figure I.3-9: Températures de fusion (°C) d'esters de l'acide oléique avec des alcools aliphatiques linéaires de 1 carbone à 12 carbones <sup>[79]</sup> .....	107
Figure I.3-10 : Températures de fusion (°C) d'esters linéaires et ramifiés d'huile de soja <sup>[79]</sup> .....	108
Figure I.3-11 : Viscosité d'esters méthyliques (□) et éthyliques (○) purs à 40°C <sup>[81]</sup> .....	109
Figure I.3-12 : Effet du nombre de carbone de l'alcool d'estérification sur la viscosité dynamique (cP) d'esters de l'acide oléique en fonction de la température (°C) <sup>[79]</sup> .....	110
Figure I.4-1 : Représentation schématique du cycle de la biocatalyse <sup>[86]</sup> .....	116
Figure I.5-1 : Réaction d'hydrolyse des Tri-Acyl-Glycérols par les lipases.....	118
Figure I.5-2 : Réactions catalysées par les lipases.....	119
Figure I.5-3: Repliement chez les α/β.hydrolases <sup>[103]</sup> .....	121
Figure I.5-4 : Taux d'hydrolyse de la triactéine partiellement soluble dans l'eau par les estérases et les lipases <sup>[106]</sup> .....	123
Figure I.5-5 : mécanisme d'activation de la sérine catalytique chez les α/β hydrolases.....	125
Figure I.5-6: Mécanisme catalytique des lipases <sup>[110]</sup> .....	127
Figure I.5-7 : Classification des α/β Hydrolases <sup>[115]</sup> .....	130
Figure I.5-8 : Représentation schématique des sites actifs des lipases de <i>Candida antarctica</i> (CALB), de <i>Burkholderia cepacia</i> (BCL=PCL), de <i>Rhizomucor miehei</i> (RML), et de <i>Candida rugosa</i> (CRL) <sup>[123]</sup> .....	133
Figure I.5-9 : Représentation de Fisher d'une molécule de triacylglycérol. Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par les lipases.....	134
Figure I.5-10 : Site actif de la lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> <sup>[138]</sup> .....	137
Figure I.5-11 : Représentation des différents types de fossés histidine <sup>[139]</sup> .....	138

Figure I.5-12 : Exemple de molécules chirales.....	140
Figure I.5-13 : Règles de Kazlauskas pour la résolution enzymatique des alcools secondaires <sup>[151]</sup> .....	142
Figure I.5-14 : Représentation schématique des procédés classiques d'immobilisation enzymatique.....	145
Figure I.5-15 : Schématisation des phénomènes de transfert rencontrés au cours des réactions mettant en œuvre une lipase immobilisée sur un support poreux <sup>[179]</sup> .....	151
Figure I.5-16 : Effet de la teneur en eau ( $a_w$ ) sur l'activité de synthèse de 2-monoglycérides lors de l'éthanololyse de triglycérides catalysée par la lipase de <i>Candida antarctica B</i> (Novozyme 435) (○), de <i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme RM IM) (□), de <i>Bulkorderia cepacia</i> (Lipase PS C-I) (●) et <i>Thermomyces lanuginosa</i> (Lipozyme TL IM) (■) <sup>[186]</sup> ..	155
Figure I.6-1: Schéma du mécanisme réactionnel de type Ping-Pong Bi-Bi chez les lipases.	157
Figure I.6-2 : Processus d'isomérisation (migration d'acycle) des MAG ou DAG avec formation d'un intermédiaire cyclique à 5 atomes.....	161
Figure I.6-3: Influence de la température lors de l'isomérisation naturelle des <i>sn</i> 2-MAG en <i>sn</i> 1(3) MAG (figure A) et des <i>sn</i> 1, 2-DAG en <i>sn</i> 1, 3-DAG (figure B) <sup>[205, 207]</sup> . Les températures respectives sont indiquées sur les figures.....	162
Figure I.6-4 : Effet des solvants organiques sur les rendements de transestérification <sup>[225]</sup> . Les solvants listés en abscisses sont classés selon leur Log(P). .....	175
Figure I.6-5 : Taux de transestérification d'un mélange d'huile de soja et de colza par le méthanol catalysé par Novozyme 435 : effet inhibiteur du méthanol à ratio molaire méthanol/huile supérieur à 1,5 <sup>[248]</sup> .....	176
Figure I.6-6 : Cinétique de méthanolyse d'huile végétale par Novozyme 435 <sup>[248]</sup> .....	177
Figure I.6-7: Interestérification entre triglycérides et acétate de méthyle pour la production d'esters méthyliques d'acides gras.....	183
Figure I.6-8: Transestérification de triglycérides par les dialkyl carbonate. (A) diméthyl-carbonate. (B) diéthyl-carbonate.....	185
Figure I.6-9 : Schéma du Réacteur Continu Agité et du Réacteur à Lit Fixe.....	187
Figure I.6-10 : Procédé continu de production de biodiesel avec trois réacteurs à lit fixe en série <sup>[277]</sup> .....	189
Figure II.5-1 Kinetics of transesterification of refined high-oleic sunflower oil with butanol in <i>tert</i> -butanol catalyzed by Novozyme 435 (A) at 60°C, Lipozyme RM IM (B), Lipozyme TL IM (C) and Lipase PS Amano IM (D) at 40°C.....	229

Figure II.5-2 : Kinetics of transesterification of refined high oleic sunflower oil with butanol in solvent free medium catalyzed by Novozyme 435 (A) at 60°C, Lipozyme RM IM (B), Lipozyme TL IM (C) and Lipase PS Amano IM (D) at 40°C. ....	230
Figure II.5-3: butyl ester yields obtained during transesterification of refined (◊) and crude (◻) high-oleic sunflower oils for production of fatty acid butyl esters with <i>tert</i> -butanol (empty signs) or without solvent (filled signs).....	234
Figure II.5-4 : DAG (Δ), MAG (◊) and Ester (◻) yields measured in the PBR outflow at equilibrium with increasing butanol / oil ratio. ....	236
Figure II.5-5 MAG yield (◆ / left axis) and butyl ester yield (■ / right axis) measured in the PBR outflow at equilibrium flow rate and at steady state versus the initial TAG concentration. ....	238
Figure II.5-6 : Flow rates (ml.h <sup>-1</sup> ) obtained at equilibrium versus initial TAG concentration (mM).....	240
Figure II.5-7 : Productivity of final mixture (◆) and productivity of purified butyl esters (◻) versus initial TAG concentrations (mM). ....	241
Figure III.5-1: Total tocopherol concentration (mg/kg) in high-oleic sunflower oil (◆) and butyl ester mixtures (◻), at different stages of the aqueous refining process.....	266
Figure III.5-2: Sterols (mg.100g <sup>-1</sup> ) contained in high-oleic sunflower oil (◆) and butyl ester mixtures (◻), at different stages of the aqueous refining process. ....	268
Figure IV.6-1: Relative initial reaction rates of esterification in presence of Novozyme 435 <sup>®</sup> pre-treated with glycerol. ....	294
Figure IV.6-2 : Residual glycerol concentrations (mM) after contact of different quantities (g) of Accurel (■) & Lewatit VP OC 1600 (◆). ....	295
Figure IV.6-3 : Residual glycerol concentrations (mM) after contact with different quantities (g) of Accurel (◻), Lewatit VP OC 1600 (◊) with a butyl-oleate and butanol containing solution of glycerol at room temperature. ....	296
Figure IV.6-4 : Comparison of adsorption curves for the adsorption of CalB on Accurel MP1000 with protocol A (○), protocol B (Δ) and protocol C (◊) at room temperature. ....	299
Figure IV.6-5 : Comparison of adsorption curves for the adsorption of CalB on Accurel MP1000 (◊) and on Accurel MP1001 (◻) pre-wetted with acetone (Protocol C) at room temperature.....	300
Figure IV.6-6 : Comparison between the yield of <i>Candida Antarctica</i> lipase B immobilization on Accurel MP1001 using Protocol C (◻ / right axis) and the resulting production cost of the immobilized lipase (◊ / left axis).....	304

Figure IV.6-7 : Comparison between the costs of packed bed reactor designed for different conditions of immobilization of CalB on Accurel MP1001 ( $\diamond$ ) and the cost of corresponding volumes of immobilized enzyme ( $\Delta$ ). .....	311
Figure IV.6-8 : Total reactor and enzyme cost optimisation for a butyl-oleate production of 10000 tons per year, for a process lifetime of 10 years with an enzyme renewal every 6 months ( $\diamond$ ), 12 months ( $\square$ ) and 24 months ( $\Delta$ ). .....	314
Figure V.5-1: Computed water solubility in the reaction media at 100% conversion at 60 °C with $OA_i = 1$ M (A) or 1.5 M (B) and three initial IB:OA ratios, Ratio = 1 (black bar), R = 2 (gray bar) and R = 3 (light gray bar). .....	337
Figure V.5-2: Variations in $a_w$ in the reaction medium as a function of the stage of advancement of the reaction (with 10% of conversion increments) in solvent systems (A) or solvent free-system (B). .....	340
Figure V.5-3: Comparison of K values calculated from modeled activities at hypothetical conversions of 85% (A), 90% (B) at 60 °C. ....	342
Figure V.5-4 : Influence of the IB:OA molar ratio on continuous conversion of OA in SFS at flow rates of 1 ml.min <sup>-1</sup> ( $\blacksquare$ ), 0.5 ml.min <sup>-1</sup> ( $\blacktriangle$ ) and 0.1 ml.min <sup>-1</sup> ( $\bullet$ ). .....	345
Figure V.5-5 : Conversion measured in the reactor outflow ( $\blacktriangle$ ) and pure ester productivity ( $\square$ ) vs. IB:OA <sub>i</sub> molar ratio. ....	346



## INDEX DES TABLES

Table I.2-1: Composition moyenne en acide gras (% mol) de quelques huiles végétales d'importance industrielle.....	59
Table I.2-2: Classification des huiles selon leur teneur en acides gras majoritaires <sup>[26]</sup> .....	60
Table I.2-3: Distribution positionnelle des acides gras majeurs dans les triglycérides de certaines huiles végétales (% mol) <sup>[28]</sup> .....	61
Table I.2-4: Teneur en tocophérols d'huiles végétales (mg/kg) <sup>[30, 31]</sup> .....	65
Table I.2-5: Composition en stérols (mg/100g) d'huiles d'intérêt industriel <sup>[33]</sup> .....	68
Table I.2-6: Teneur en métaux de quelques huiles d'intérêts <sup>[43]</sup> .....	73
Table I.2-7: Méthodes de raffinage physique des huiles végétales brutes <sup>[47]</sup> .....	79
Table I.3-1 : Quelques propriétés physico-chimiques d'huiles végétales et des esters méthyliques issus de ces mêmes huiles <sup>[55]</sup> .....	90
Table I.3-2: Viscosité cinématique dans les normes diesels.....	100
Table I.3-3 : Valeurs de résistance oxydative mesurée par la technique de Rancimat à 110°C, avec 10L.min <sup>-1</sup> d'oxygène <sup>[73]</sup> .....	102
Table I.3-4 : Mesure de l'index de stabilité oxydative (OSI) (h) de 5g de composés lipidiques purs à 70°C et 90°C <sup>[83]</sup> .....	112
Table I.4-1 : Image de l'intérêt industriel pour la biocatalyse et de la biotransformation au travers de brevets d'intérêts publiés dans le domaine entre 2000 et 2004 <sup>[87]</sup> .....	114
Table I.5-1 : Spécificité, support et producteur de lipases commerciales usuelles <sup>[135]</sup> .....	136
Table I.5-2 : Exemples de résolution de mélanges racémiques par les lipases.....	141
Table I.5-3: Exemple de supports d'immobilisation des lipases commerciaux classiquement rencontrés dans la littérature.....	146
Table I.5-4 : Activité de l'eau de solutions de sels saturées à 25°C <sup>[191]</sup> .....	156
Table I.6-1: Comparaison des temps de demi-vie des <i>sn1,2</i> -DAG et des <i>sn2</i> -MAG lors du processus de migration d'acyle en fonction la température <sup>[205, 207]</sup> .....	163
Table I.6-2: Production d'esters d'acides gras par catalyse enzymatique à partir de différentes matières premières, alcools et type de réacteur.....	166
Table II.4-1 Characteristics of the immobilized lipase tested for transesterification of high-oleic sunflower oil.....	224
Table III.4-1: Fatty acid compositions of the oils used in this study.....	258
Table III.5-1: Phosphorus concentrations and calculated phospholipid concentrations in crude RSO (rapeseed oil) and butyl-ester mixtures.....	263
Table III.5-2: Individual tocopherol/tocotrienol concentrations (mg/kg) in crude and refined HOSO (High-Oleic Sunflower Oil) and butyl esters produced from them.....	267

Table III.5-3: Individual sterol proportions (%) in crude and refined HOSO (high-oleic sunflower oils) and butyl esters produced from them. ....	269
Table III.5-4: Phenolic compound content in crude and refined olive oils (OO) and fatty acid alkyl esters (FAAE), expressed as g equivalents caffeic acid per L. ....	270
Table III.5-5: Induction periods (h) of oils and fatty acid alkyl esters (FAAE) from different sources, obtained with the Rancimat method. ....	272
Table IV.6-1 : Characteristics of the PBR developed for different conditions of CalB immobilisation on Accurel MP1001 using protocol C carrying out acetone for support pre-treatment. ....	307
Table IV.6-2 : Marshall and Swift Equipment Cost Index (MSECI) (1926 Index =100) and the Chemical Engineering Plant Cost Index (CEPCI) used in the reactor cost estimation. ....	307
Table V.5-1: Initial rates and steady-state conversion of esterification batch reaction of OA by IB. ....	344
Table V.5-2: Conversion obtained with the production of first and second generation FAAE. ....	349



# INDEX DES ABBREVIATIONS

### Acronymes Français.

1O2	Oxygène à singulet
3O2	Oxygène à triplet
AAL	Acide $\alpha$ -Linoléique.
AC	Acide Caprique
AG	Acide Gras
AGMI	Acide Gras Mono-Insaturés
AGPI	Acides Gras Poly-Insaturés
AGS	Acides Gras Saturés
AL	Acide Linoléique
ALR	Acide Laurique
AM	Acide Myristique
AS	Acide Stéarique
CalB	Lipase B de Candida antarctica
CCNUCC	Convention-cadre des Nations unies sur les changements climatiques
CMR	Cancérogènes, Mutagènes, toxiques pour la Reproduction
CO2	Dioxyde de carbone
DAG	DiAcylGlycérols
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
HFC	Hydrofluorocarbure
MAG	MonoAcylGlycérols
N2O	Oxyde nitreux
OGM	Organismes Génétiquement Modifiés
ONU	Organisation des Nations Unies
PFC	Perfluorocarbure

Sen	Sensibilisateur
SF6	Hexafluorure de soufre
TAG	TriAcylGlycérols
THO	Tournesol Hautement Oléique
UIC	Union des Industries Chimiques
VNA	Valeur Nette Actualisée

### **English Acronyms**

2M2B	2-méthyl-2-butanol
BP	Boiling Point
CEPCI	Chemical Engineering Plant Cost Index
CP	Cloud Point
DAG	DiAcylGlycerols
DIPE	DiIsoPropyl Ether
ECA	European Chemicals Agency
EPA	Environmental Protection Agency
FA	Fatty Acids
FAAE	Fatty Acid Alkyl Esters
FAME	Fatty Acid Methyl Esters
GTL	Gaz to Liquid
HOSO	High-Oleic Sunflower Oils
IB	IsoButanol
MAG	MonoAcylGlycerols
MSECI	Marshall and Swift Equipment Cost Index
NPV	Net present value

OA	Oleic Acid
OO	Olive Oils
PBR	Packed-Bed Reactor
PLs	Phospholipids
pNPB	para-NitroPhenyl Butyrate
PP	Pour Point
REACH	Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals
RSO	Rapeseed Oil
SFS	Solvent-Free System
TAG	TriAcylGlycerols
TMSH	TriMethyl Sulfonium Hydroxide
WBCSD	World Business Council for Sustainable Development

# INTRODUCTION GENERALE

*"Mieux vaut prendre le changement par la main avant qu'il ne vous prenne par la gorge."*

*Winston Churchill*

L'humanité fait peut-être face actuellement à l'un des plus grands challenges de son histoire : la mutation d'une société de consommation vers une société durable. Le remplacement du pétrole dans la synthèse des dérivés chimiques devient l'enjeu clé de cette mutation. En effet, l'amointrissement des ressources pétrolières, la versatilité des cours du pétrole, les émissions de gaz à effet de serre responsable du réchauffement climatique planétaire sont autant d'arguments justifiant l'intérêt de développer des voies alternatives de synthèse à partir de matières premières renouvelables. Cette prise de conscience collective est le premier moteur pour contraindre les compagnies et gouvernements, à développer des productions propres de produits respectueux de l'environnement et de la santé.

Soucieux de l'environnement et à l'écoute des besoins du marché, Syngenta Seeds a été l'un des premiers semenciers à investir pour ce futur. En particulier, Syngenta Seeds investit dans les oléo-protéagineux en tant que ressource naturelle pour créer une chimie de substitution des huiles minérales. Si tout le monde connaît le développement du biodiesel en Europe, soutenu par les Pouvoirs Publics, le potentiel des huiles végétales dans l'oléochimie est encore sous-estimé : bio-lubrifiants, bio-surfactants, plastiques ...

Mon projet de thèse a consisté à développer des procédés innovants de première transformation des huiles, répondant aux exigences du développement durable. L'objectif est d'apporter un soutien aux industriels Business to Business, Business to Consumer et aux consommateurs finaux en proposant une expertise répondant à leurs besoins.

La biocatalyse, qui consiste en l'utilisation de cellules entières ou d'enzymes pour effectuer des réactions chimiques, est considérée comme une technologie propre et respectueuse de

l'environnement. L'utilisation de lipases immobilisées constitue donc une voie alternative à la transformation chimique des huiles. Cependant, la mise en œuvre des enzymes et plus particulièrement des lipases dans des procédés industriels reste rare et limitée. Le principal obstacle à leur développement est le prix souvent élevé des biocatalyseurs disponibles sur le marché. Cela impose donc de développer des procédés de type continu. Des procédés hautement productifs et stables pendant des semaines voire des mois sans remplacement du biocatalyseur permettront de réduire l'incidence du coût des enzymes sur le produit final. Ainsi, le challenge est de déterminer le compromis optimal entre productivité et stabilité afin de donner une pertinence économique aux systèmes, et de développer des procédés où la biocatalyse peut offrir une valeur ajoutée plus importante qu'avec les procédés chimiques conventionnels.

Ce rapport de thèse débute par un état de l'art approfondi permettant l'appréhension de l'ensemble des différents enjeux, objectifs et problématiques liés aux travaux de cette thèse. Il est organisé en six sous-chapitres. Le premier est consacré à la présentation de ce contexte mondial particulier qu'est l'orientation vers le développement durable. Le deuxième présente les huiles végétales, matières premières renouvelables utilisées dans cette étude. La troisième partie aborde les esters d'acides gras, produits essentiellement ciblés lors de la transformation des huiles. Ce sous-chapitre permet de justifier l'intérêt de la transformation des huiles en esters. Les quatrième, cinquième et sixième sous-chapitres traitent plus particulièrement de la mise en œuvre des lipases dans des réactions de synthèse et des limitations liées à leur utilisation dans les réactions de transestérification des huiles.

La partie suivante regroupe les résultats obtenus au cours de cette thèse, lesquels sont présentés sous la forme de quatre publications. Le premier article évoque la mise au point

d'un réacteur enzymatique à lit fixe permettant de catalyser la réaction de butanolyse de l'huile brute de tournesol hautement oléique. Dans cet article, le Novozyme 435, lipase B de *Candida antarctica*, immobilisée disponible dans le commerce, a été choisie. Le second article estime les bénéfices de l'utilisation d'huiles vierges en tant que substrat, au niveau de la qualité de résistance oxydative des esters obtenus à l'aide du réacteur développé dans l'article précédent. Une stratégie d'immobilisation de la lipase B de *C. antarctica* (formulation commerciale liquide) sur support de polypropylène, permettant de minimiser les dépenses liées au biocatalyseur, est abordée dans le troisième article. Enfin, le dernier article décrit une voie alternative de production d'esters intégrant une première étape d'hydrolyse suivie d'une réaction d'estérification enzymatique, schéma de production permettant une augmentation substantielle des productivités par kg de lipase.

Bonne lecture !

I : ETAT DE L'ART.

---

## **I.1 Vers un développement durable.**

### **I.1.1 Historique, enjeux et objectifs du développement durable.**

Le concept de développement durable est une notion dont l’émergence a été lente. Les premières discussions et la prise de conscience mondiale datent de 1968 avec la création du club de Rome qui a pour but de cerner les limites de la croissance économique. En 1972, le rapport intitulé “*The limits to growth*”<sup>[1]</sup> publié par le Club de Rome prévoit à long terme (fin du XXI<sup>ème</sup> siècle) une chute brutale des populations due à la pollution, à l’appauvrissement des sols cultivables et à la diminution des ressources fossiles. La même année, au cours de la conférence des Nations Unies à Stockholm, considérée comme le premier Sommet de la Terre, l’environnement apparaît pour la première fois comme un patrimoine essentiel à transmettre.

Les chocs pétroliers de 1973 et 1979 font prendre conscience aux pays développés que leur prospérité matérielle n’est basée que sur l’utilisation intensive de ressources naturelles finies. Par conséquent, outre l’économique et le social un troisième aspect du développement se révèle avoir été ignoré et négligé : l’environnement.

Le terme de développement durable ne fait son apparition qu’en 1980 dans un rapport intitulé la “*Stratégie mondiale pour la conservation*”<sup>[2]</sup> pour montrer que le développement doit amener des améliorations de la qualité de vie des hommes, et en même temps doit conserver la vitalité et la diversité de la Terre. Une réelle définition du développement durable est donnée en 1987 par la commission mondiale sur l’environnement et sur le développement au travers du rapport dit Brundtland du nom de sa présidente Gro Harlem Brundtland, intitulé “*Our Common Future*”<sup>[3]</sup> :

*« Un développement qui répond aux besoins des générations du présent sans compromettre la capacité des générations futures à répondre aux leurs. Deux concepts sont inhérents à cette notion : le concept de « besoins », et plus particulièrement des besoins essentiels des plus démunis à qui il convient d'accorder la plus grande priorité, et l'idée des limitations que l'état de nos techniques et de notre organisation sociale impose sur la capacité de l'environnement à répondre aux besoins actuels et à venir. »*

Ce rapport prône la préservation de l’environnement et la consommation prudente des ressources naturelles non renouvelables. Il insiste sur la nécessité de protéger la diversité des gènes, des espèces et de l'ensemble des écosystèmes naturels terrestres et aquatiques, et ce, notamment, par des mesures de protection de la qualité de l'environnement, par la restauration, l'aménagement et le maintien des habitats essentiels aux espèces, ainsi que par une gestion durable de l'utilisation des populations animales et végétales exploitées.

Il rappelle le propos prêté à Antoine de Saint-Exupéry : *'nous n'héritons pas de la Terre de nos ancêtres, nous l'empruntons à nos enfants'*. Ce rapport place l’homme au centre de son propre développement car l’environnement ne peut être isolé des actions de l’homme, de ses ambitions et de ses besoins.

Certains analystes perçoivent désormais le développement industriel comme étant non viable sur le plan environnemental. Les points cruciaux en faveur de cette affirmation sont l'épuisement des ressources naturelles (matières premières, énergies fossiles etc...), la destruction ou la fragmentation des écosystèmes, la diminution de la biodiversité ou encore le changement climatique supposé dû aux émissions de gaz à effet de serre ainsi qu'à la pollution due aux activités humaines. Les catastrophes naturelles, la fonte des glaciers, l'élévation du niveau des mers (etc...), conséquences directes du réchauffement climatique, et

---

les catastrophes industrielles à répétition interpellent désormais l’opinion publique et les associations.

Dans le même temps, le sommet de Rio modifie le principe de développement durable décrit par le rapport Brundtland<sup>[3]</sup> en définissant les trois piliers (

Figure I.1-1) devant être conciliés dans une perspective de développement durable : le progrès économique, la justice sociale et la préservation de l’environnement.

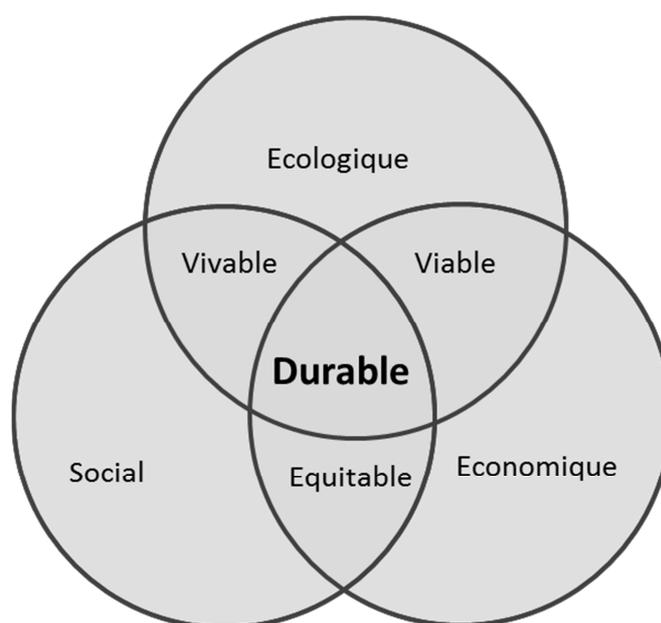


Figure I.1-1: Schéma du développement durable : à la confluence des trois piliers du développement durable<sup>[3]</sup>.

---

Le développement durable n’est pas sans conséquence pour la communauté car il pose les jalons de nouveaux concepts tels que l’**écologie industrielle**, la **production propre** ou encore la **chimie verte**. Une idée commune à ces concepts est la minimisation des déchets : il est préférable d’éviter la génération de déchets plutôt que les traiter en fin de procédé. Celle-ci est établie sous la forme d’une hiérarchie pyramidale (Figure I.1-2).

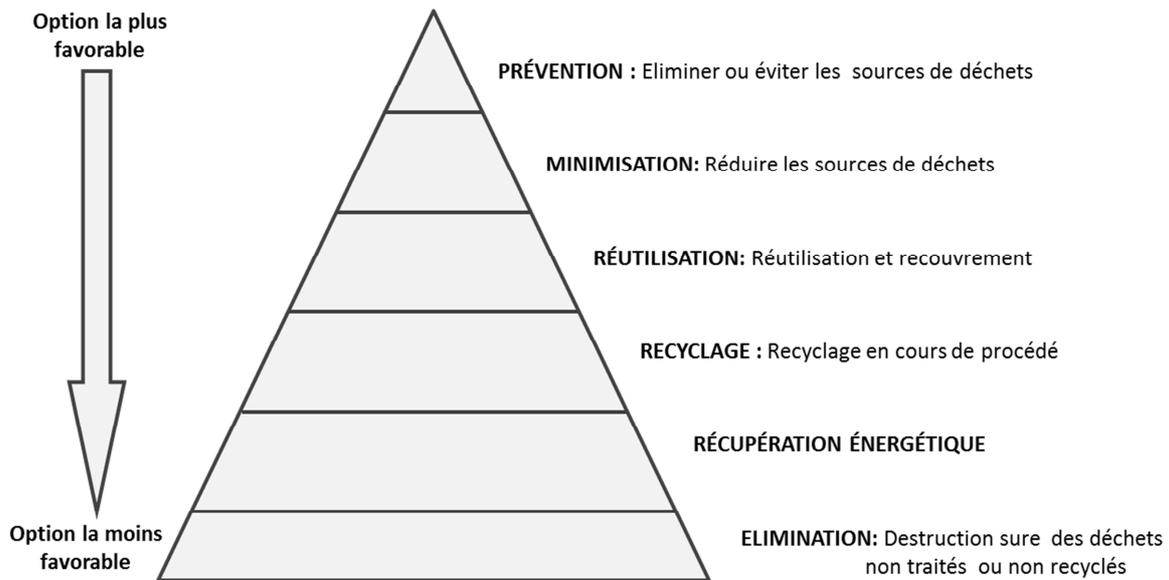


Figure I.1-2 : Schéma de la hiérarchisation de la minimisation des déchets<sup>[4]</sup>

Excepté ce but commun d’apporter un changement vers une industrie durable pour l’environnement, les trois concepts se distinguent les uns des autres par leurs approches de la problématique.

### L’écologie industrielle.

Le principe de développement durable implique que les systèmes constitutifs de la société humaine (système social, infrastructures, activités économiques ...) et l’environnement qui les englobe soient totalement interdépendants. Les liens et les échanges entre la société et l’environnement sont indéniables.

L’écologie industrielle propose de considérer le système industriel comme une forme particulière d’écosystème. Elle donne une vision globale des interactions entre la société industrielle et la biosphère. L’écologie industrielle ne considère plus les problèmes comme des boîtes isolées, mais intègre l’économie, les sciences de l’ingénieur, l’écologie scientifique, la

géographie, l'aménagement du territoire et de nombreuses autres disciplines pour aboutir à une harmonisation globale des relations entre un territoire et son environnement.

La stratégie opérationnelle de l'écologie industrielle comporte quatre axes principaux <sup>[5]</sup> :

- Valoriser systématiquement les déchets : création de réseaux d'utilisation des ressources et des déchets dans les écosystèmes industriels, de sorte que tout résidu devienne une ressource pour une autre entreprise ou un autre agent économique.
- Minimiser les pertes par dissipation : limiter l'impact environnemental de l'utilisation ou la consommation du produit.
- Dématérialiser l'économie : minimisation des flux totaux de matière (et d'énergie) tout en assurant des services au moins équivalents.
- Décarboniser l'énergie : rendre la consommation d'hydrocarbures moins dommageable (par exemple en récupérant le gaz carbonique issu de la combustion) et favoriser la transition vers une diète énergétique moins riche en carbone fossile (énergies renouvelables, économies d'énergie).

### La production propre.

Le principe de base d'une production plus propre est la réduction des déchets et des émissions à leur source, l'économie des matières brutes, d'eau, d'énergie et des coûts qui y sont associés. Le terme de "production plus propre" fut défini la première fois par un groupe d'experts du Programme Environnement des Nations Unies (UNEP)<sup>[6]</sup>. La production plus propre est l'application continue des stratégies environnementales préventives intégrées, appliquées aux procédés, produits et services pour augmenter l'éco-efficience et réduire les risques envers les humains et l'environnement<sup>[7]</sup>.

---

## La chimie verte.

La chimie verte sera abordée plus longuement dans la prochaine section I.1.2.

### **I.1.2 La Chimie verte**

Les organiciens, Paul Anastas et John Warner, de la ‘‘US Environmental Protection Agency EPA’’ définissent pour la première fois dans les années 90 le concept de chimie verte qu’ils caractérisent de serment d’Hippocrate des chimistes <sup>[8]</sup>. Son but principal est d’aider le chimiste dans sa démarche en orientant vers des produits, des voies de synthèse ou des procédés permettant de réduire, voire d’éliminer complètement l’utilisation de produits chimiques dangereux. Pour ce faire, il convient de respecter les 12 principes de la chimie verte :

- (1) Il est préférable de prévenir les déchets plutôt que de les traiter après formation
- (2) La voie de synthèse doit être développée dans une optique d’optimisation de l’incorporation du matériel utilisé dans le produit final
- (3) Dans la mesure du possible, les voies de synthèse doivent être conçues pour utiliser et générer des substances présentant la plus faible (voire aucune) toxicité possible pour la santé humaine ou l’environnement.
- (4) Les produits chimiques doivent être conçus pour préserver l’efficacité de fonction tout en réduisant la toxicité.
- (5) L’utilisation de substances alternatives (ex: solvants, agents de séparation etc.) doit être rendue inutile dans la mesure du possible et inoffensive si nécessaire.
- (6) Les besoins énergétiques doivent être minimisés pour leurs impacts économiques et environnementaux. Il est préférable de conduire les voies de synthèse à température ambiante et à pression atmosphérique.

- 
- (7) Les sources de matières premières doivent être renouvelables quand cela est techniquement et économiquement possible.
  - (8) Les dérivations non nécessaires (groupes bloquants, protections/déprotections, modifications temporaires des procédés chimiques ou physiques) doivent être évitées autant que possible.
  - (9) L'utilisation des procédés catalytiques est préférable aux procédés stoechiométriques, cela implique la recherche de nouveaux réactifs plus efficaces et minimisant les risques en terme de manipulation et de toxicité.
  - (10) Les produits chimiques doivent être conçus de manière qu'à la fin de leur fonction, ils ne persistent pas dans la nature et se décomposent en produits de dégradation inoffensifs.
  - (11) Les méthodes analytiques nécessitent un développement accru pour permettre une surveillance en temps réel et en ligne et un contrôle antérieur à la formation de substances secondaires dangereuses.
  - (12) Les substances utilisées dans le procédé et leurs formes (solide, liquide, gaz) doivent être réfléchies afin de minimiser les risques d'accidents chimiques tels que des largages dans l'environnement, des explosions ou des incendies.

Ce faisant, Anastas et Warner définissent un certain nombre d'outils de la chimie verte : les matières premières alternatives, les réactifs alternatifs, les solvants alternatifs, les produits alternatifs (molécules cible), la chimie analytique de procédé. Récemment Tang et coll., 2005<sup>[9]</sup> ont proposé un acronyme mnémotechnique des 12 principes de la chimie verte, ‘**PRODUCTIVELY**’, signifiant :

---

**P** - Prevent wastes

**R** - Renewable materials

**O** - Omit derivatization steps.

**D** - Degradable chemical products

**U** - Use safe synthetic methods

**C** - Catalytic reagents.

**T** - Temperature, Pressure Ambient

**I** - In-Process Monitoring

**V** - Very few auxiliary substances

**E** - E-factor, maximises feed in product

**L** - Low toxicity of Chemicals products

**Y** - Yes, it is safe

Ces 12 principes ont dès lors inspiré de nombreux auteurs, pour qui le concept énoncé par Anastas et Warner, pouvait être élargi et amélioré. Ainsi Neil Winterton énonce les “12 principes supplémentaires de la chimie verte” dans le but de comparer “l’efficacité verte” des procédés et d’estimer leur potentiel de minimisation de déchets <sup>[10]</sup> :

- (1) Identifier et quantifier les co-produits
- (2) Rapporter les conversions, sélectivités et productivités
- (3) Etablir la balance massique pour le procédé
- (4) Quantifier les pertes de catalyseurs et solvants
- (5) Examiner la thermochimie basique des réactions pour identifier de possibles processus exothermes dangereux
- (6) Anticiper les limitations de transfert massique ou d’énergie potentielles.
- (7) Consulter un ingénieur chimiste ou de procédé (scale up).

- 
- (8) Considérer l'effet de l'ensemble du procédé sur le choix de la chimie.
  - (9) Aider, développer et appliquer les mesures de viabilité
  - (10) Quantifier et minimiser l'usage d'utilités (eau, gaz, électricité etc..) et autres entrants.
  - (11) Identifier où la sécurité de l'opérateur peut être incompatible avec la réduction des déchets
  - (12) Contrôler, rapporter et minimiser tous les déchets émis dans l'air, dans l'eau ou sous forme solide par chaque expérience ou par le laboratoire globalement.

Anastas et Zimmerman, 2003<sup>[11]</sup>, ont, quant à eux, prolongé le concept aux 12 principes de l'ingénierie verte. Ces derniers représentent une structure permettant aux scientifiques et aux ingénieurs de concevoir de nouveaux matériaux, produits et procédés, bénins pour la santé humaine et l'environnement.

Cependant, les 12 principes de la chimie verte n'ont pas échappé aux critiques. Graedel, 1999<sup>[12]</sup>, déplore que les principes de la chimie verte ne tiennent pas compte de la vie totale du produit ou procédé, "de la vie à la mort ou de la vie à la réincarnation". Il propose dès lors d'ajouter la perspective de cycle de vie aux principes de chimie verte pour en élargir l'horizon et en augmenter les bénéfices environnementaux. Cela permet de considérer les 5 stades de la vie d'un produit : (1) la préfabrication, (2) la fabrication, (3) la livraison du produit, (4) l'utilisation du produit, (5) la fin de vie du produit, chaque étape étant caractérisée par les ressources utilisées. Cela représente autant de niveaux d'implication des principes de la chimie verte.

---

### **I.1.3 Le contexte réglementaire**

De nombreuses dispositions réglementaires ou légales orientent le développement durable et plus particulièrement la maîtrise des énergies, des déchets et des produits ayant un impact sur l’environnement et/ou la santé.

Celles-ci sont établies aussi bien à un niveau national avec l’entrée en vigueur en France des lois Grenelle Environnement qu’à un niveau international avec la ratification du protocole de Kyoto sous l’égide de l’ONU, ou encore l’entrée en vigueur du règlement européen REACH.

#### **I.1.3.1 Au niveau national : le ‘Grenelle Environnement’.**

Le **Grenelle Environnement** fait référence à un ensemble de rencontres réunissant l’ensemble des acteurs du développement durable, organisées en France en octobre 2007 et visant à prendre des décisions à long terme en matière d’environnement et de développement durable. Les discussions ont été organisées autour de six groupes de travail, permettant de proposer des mesures appropriées aux problématiques abordées. Les groupes sont composés de 40 membres répartis en 5 collèges (Etat, collectivités locales, ONG, employeurs et les salariés)<sup>[13]</sup> :

- Groupe 1 : Lutter contre les changements climatiques et maîtriser l’énergie.
- Groupe 2 : Préserver la biodiversité et les ressources naturelles
- Groupe 3 : Instaurer un environnement respectueux de la santé
- Groupe 4 : Adopter des modes de production et de consommation durables
- Groupe 5 : Construire une démocratie écologique
- Groupe 6 : Promouvoir des modes de développement écologiques favorables à l’emploi et à la compétitivité.

Des discussions intergroupes ont été organisées sur les thèmes de :

- La gestion des OGM.
- La gestion des Déchets.

---

Le Grenelle Environnement a fait l’objet d’une proposition de loi qui fut adoptée définitivement en Juin 2009. Cette loi reprend l’ensemble des propositions établies par les groupes. Très récemment, une loi Grenelle II a été ratifiée par le Sénat le 8 Octobre 2009, qui renforce encore les engagements de l’état Français pour assurer sa mutation écologique.

### I.1.3.2 Au niveau européen : Le règlement REACH

Le règlement européen REACH correspond textuellement à l’acronyme de “Registration, Evaluation, Autorisation and restriction of Chemicals<sup>[14]</sup>. Ce règlement, entré en force le 1<sup>er</sup> Juin 2007, a pour but de connaître la toxicité et les conséquences sur la santé et l’environnement, des produits chimiques, de savoir où se trouvent ces produits chimiques et de repérer plus largement leurs utilisations. Dans cette optique, le règlement impose aux producteurs et importateurs de produits chimiques d’apporter la preuve que les risques des substances produites ou importées (de plus de 1 tonne/an) par fabricant ou importateur sont valablement maîtrisés. Il régit également l’ensemble de la chaîne aval. Dans ce cadre, à la fois les substances nouvelles et anciennes sont intégrées dans un même système. Les autorités n’ont pas la charge de l’ensemble des évaluations des risques mais il a été créé pour cela une procédure d’autorisation. Une agence européenne des produits chimiques, la ‘European Chemicals Agency’ (ECA) gère le dispositif.

Pour les autres substances susceptibles de présenter des risques élevés, il est prévu de mettre en place une procédure de restriction (c’est-à-dire l’interdiction de certains usages). Au-delà des limites de date, l’importation ou la production de substances non enregistrées deviendra illégale (Figure I.1-3).

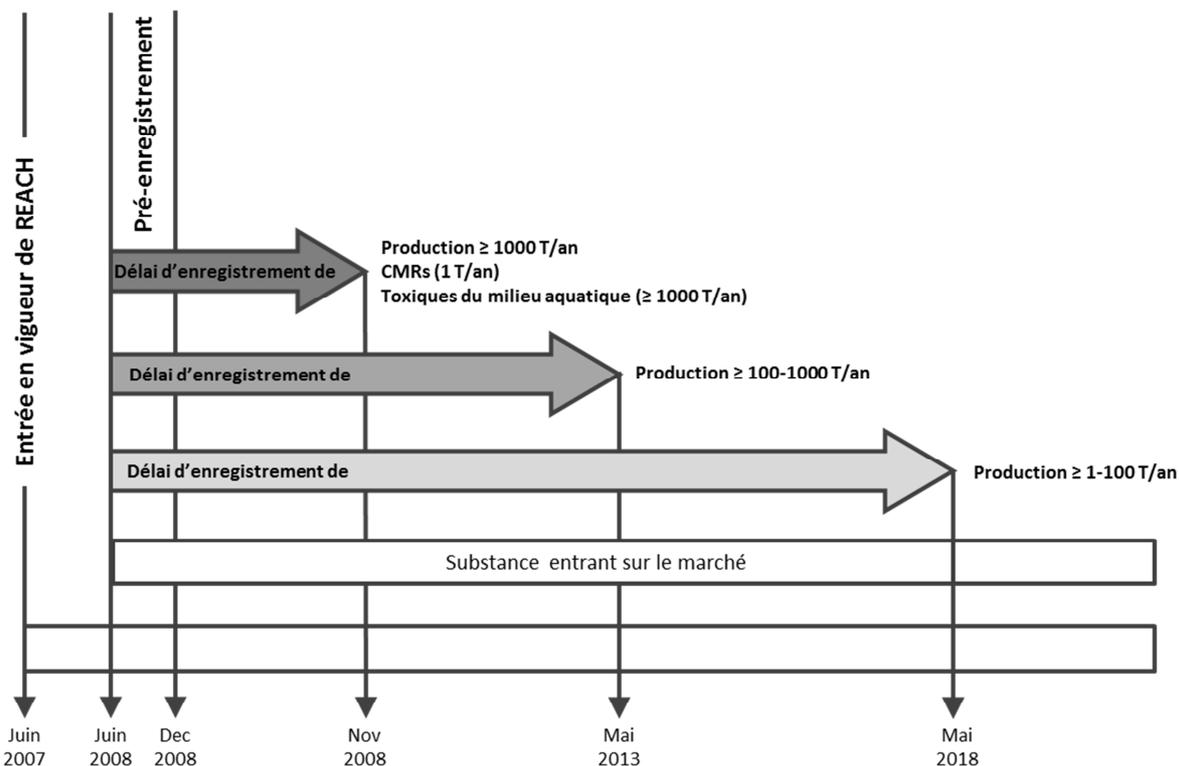


Figure I.1-3 : Calendrier d’enregistrement du Règlement REACH <sup>[15]</sup>. CMRs= Cancérigènes, Mutagènes, toxiques pour la Reproduction.

REACH donne une plus grande part de responsabilité aux industries qui gèrent les risques que leurs produits chimiques pourraient avoir sur la santé, en les identifiant clairement et en les communiquant auprès des utilisateurs.

Le but de REACH n’est pas seulement d’améliorer la protection de la santé humaine et de l’environnement vis à vis des risques liés aux substances chimiques mais aussi d’accroître la compétitivité des industries chimiques de l’union européenne, de promouvoir des méthodes alternatives pour l’évaluation des dangers liés aux produits chimiques et d’assurer une libre circulation des substances au sein du marché interne<sup>[16]</sup>. Dans ce contexte, REACH représente un formidable potentiel de recherches et d’innovations pour les industriels de la Chimie et ouvre d’immenses perspectives de développement en matière de nouveaux produits et/ou de nouveaux procédés.

---

Les Bioressources offrent des opportunités dans la recherche d’économie d’énergie, la préparation de l’après pétrole, la limitation des déchets et le développement de produits de substitution aux substances polluantes ou dangereuses et ce, nécessairement au travers du développement de “clean technologies” qui sont une chance de progresser vers l’application des principes de Développement Durable.

### I.1.3.3 Au niveau mondial : Le protocole de Kyoto.

Le protocole de Kyoto découle de la Convention-cadre des Nations unies sur les changements climatiques (CCNUCC)<sup>[17]</sup> adoptée à l’issue du Sommet de la Terre, qui s’est tenu en juin 1992 à Rio de Janeiro, au Brésil. Il est l’aboutissement de la conférence qui a réuni les représentants de 160 pays à Kyoto, au Japon, en 1997.

*« L’objectif ultime de la présente Convention [...] est de stabiliser, conformément aux dispositions pertinentes de la Convention, les concentrations de gaz à effet de serre dans l’atmosphère à un niveau qui empêche toute perturbation anthropique dangereuse du système climatique ». — Article 2 de la Déclaration de Rio.*

La ratification du protocole par 55 pays représentant 55% des émissions mondiales de gaz à effet de serre en 2004 permet son application à compter de Février 2005. Les pays signataires dits «de l’annexe» (soit 37 pays développés ou en transition vers une économie de marché comme la Russie) ont accepté globalement de réduire de 5,5% leurs émissions de gaz à effet de serre sur la période 2008-2012 par rapport au niveau atteint en 1990.

Les gaz à effet de serre concernés sont :

- le gaz carbonique ou dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) provenant essentiellement de la combustion des énergies fossiles et de la déforestation,

- 
- le méthane (CH<sub>4</sub>) qui a pour origine principale l'élevage des ruminants, la culture du riz, les décharges d'ordures ménagères, les exploitations pétrolières et gazières,
  - les halocarbures (HFC et PFC) sont les gaz réfrigérants utilisés dans les systèmes de climatisation et la production de froid, les gaz propulseurs des aérosols,
  - le protoxyde d'azote ou oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O) provient de l'utilisation des engrais azotés et de certains procédés chimiques,
  - l'hexafluorure de soufre (SF<sub>6</sub>) utilisé par exemple dans les transformateurs électriques.

Si les engagements de réduction sont ambitieux, les états signataires sont tenus de les atteindre en temps et en heure, et pour ce faire, le protocole de Kyoto prévoit la possibilité de recourir à des mécanismes dits de "flexibilité" en complément des mécanismes politiques et des mesures mis en place au niveau national :

- les "permis d'émission" : vente ou achat de droit à émettre entre pays industrialisés
- la "mise en oeuvre conjointe" : permet de procéder à des investissements entre pays développés visant à réduire les émissions de gaz à effet de serre en dehors de leur territoire et de bénéficier de crédits d'émissions générés par les réductions ainsi obtenues.
- Le "mécanisme de développement propre" permet aux pays développés d'investir dans des pays en développement pour la réduction des gaz à effet de serre.

#### **I.1.4 Outils de management environnemental.**

##### **I.1.4.1 L'analyse du cycle de vie.**

L'analyse du cycle de vie est une méthode systématique d'évaluation des impacts environnementaux d'un produit, d'un service ou d'un procédé. Son but fondamental est de réduire la pression d'un produit sur les ressources et l'environnement tout au long de son cycle de vie, depuis l'extraction des matières premières jusqu'à son traitement en fin de vie (mise en

décharge, incinération, recyclage, etc.). Ce cycle est souvent qualifié de “*du berceau au tombeau*”. L’enjeu majeur de l’analyse du cycle de vie est d’identifier les principales sources d’impacts environnementaux et d’éviter, ou le cas échéant, d’arbitrer les déplacements de pollution liés aux différentes alternatives envisagées.

En pratique, les flux de matières et d’énergies entrant et sortant à chaque étape du cycle de vie, sont inventoriés, puis on procède à une évaluation des impacts environnementaux. La complexité des phénomènes mis en jeu et en interaction impose une incertitude quant aux impacts réels des flux et on parle plutôt “d’impacts potentiels”.

L’analyse du cycle de vie est un outil décisionnel qui se déroule en 4 étapes (Figure I.1-4 ci-après). L’analyse du cycle de vie a fait l’objet d’une normalisation internationale en 1997 : Norme ISO14040.

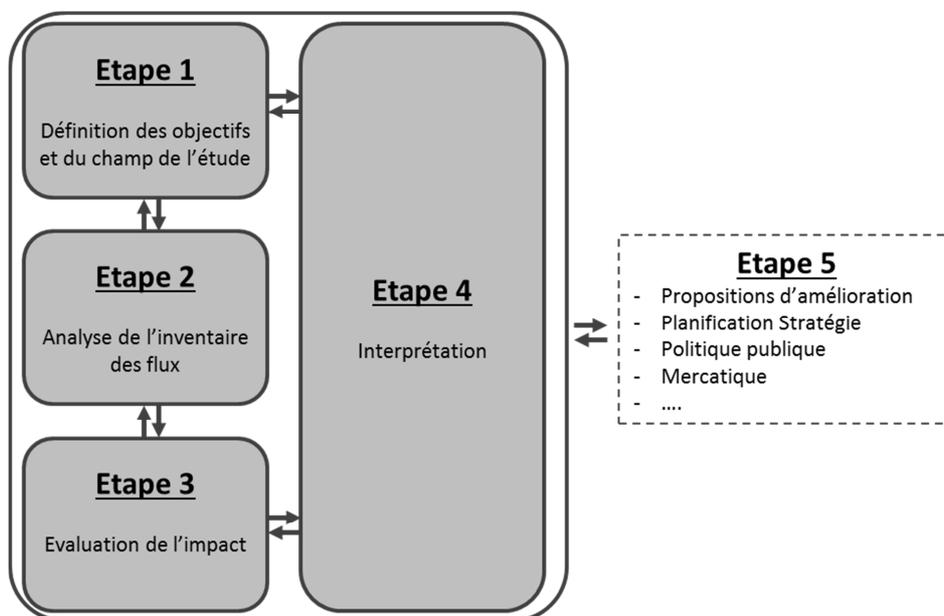


Figure I.1-4 : Diagramme des 4 étapes d’analyse du cycle de vie<sup>[18]</sup>.

---

#### I.1.4.2 L’analyse d’éco-efficience

L’Eco-Efficacité ou Eco-Efficience est un terme qui est apparu dans le rapport "Changing Course" ordonné par la World Business Council for Sustainable Development (WBCSD) et présenté lors du sommet de la terre de Rio de Janeiro en 1992 <sup>[19]</sup>.

*" L'Eco-Efficacité consiste à offrir des biens et des services à des prix compétitifs qui répondent aux besoins des hommes et leur apportent une qualité de vie, tout en réduisant progressivement les impacts environnementaux et la quantité des ressources naturelles nécessaires tout au long du cycle de vie des produits pour atteindre finalement un niveau qui soit en harmonie avec ce que peut supporter durablement la planète ".*

#### I.1.4.3 L’initiative “Responsible care”

Le programme “Responsible Care” est une initiative volontaire des industries chimiques organisée autour d’un code de conduite articulé autour de 9 principes, indépendants des normes et des dispositions réglementaires qui s’imposent aux industries signataires<sup>[20, 21]</sup>. Les compagnies unissent ainsi leurs forces grâce à des antennes associatives nationales, (en France, il s’agit de l’Union des Industries Chimiques UIC), pour (i) améliorer continuellement leur performance en termes de santé, de sécurité et d’environnement, pour (ii) communiquer avec les acteurs de leur chaîne à propos de leurs produits et procédés et pour (iii) produire des biens à bon marché et sains, apportant un réel bénéfice à la société.

“Responsible Care” aide les industries à opérer sainement, profitablement et dans le respect des générations futures au travers d’un partage d’informations, d’un système rigoureux de contrôle, d’indicateurs performants et de procédures de vérification. Ainsi, “Responsible care” incite les entreprises chimiques à être plus transparentes vis-à-vis de leur rapport à l’environnement. Cette démarche, tant individuelle que collective, permet à l’industrie

---

chimique de consolider sa réputation dans un monde où les produits chimiques sont plus considérés comme des dangers potentiels que comme des éléments contributifs au bien être de chacun.

## **I.2 Les huiles végétales, sources de carbone renouvelable.**

### **I.2.1 Généralités.**

Les huiles végétales représentent une alternative prometteuse aux ressources fossiles car elles sont renouvelables et présentent après transformation des propriétés très proches de celles des ressources fossiles. L’utilisation des huiles végétales a démarré il y a fort longtemps avec la production de savon à partir d’huile d’olive et de soude végétale qui désignait en ce temps le carbonate de sodium. Les premières traces sont datées de la civilisation sumérienne, 3000 ans avant notre ère. Plus récemment, en 1900, les premiers moteurs à compression/allumage développés par Rudolf Diesel furent testés avec de l’huile d’arachide <sup>[22]</sup>. Par la suite, du fait, d’une grande disponibilité de produits pétroliers à très faible prix, l’utilisation des huiles végétales a été abandonnée. Les huiles végétales ne sont redevenues attractives que très récemment, car permettent notamment de faire face à la diminution des stocks pétroliers.

La figure I.2-1 présente la production d’huiles végétales communes à travers le monde et selon les continents<sup>[23]</sup>. La production mondiale ne cesse de croître, même si l’augmentation a tendance à ralentir au cours des dernières années. En 2007, elle représentait un volume de 130,4 Mtonnes, soit une croissance de plus de 210% par rapport à 1990. La production est largement dominée par les pays asiatiques, qui fournissent en 2007 plus de la moitié de la production mondiale. Les continents européen et américain représentent respectivement 15% et 24% de la production mondiale. Et enfin, l’Océanie et l’Afrique assurent chacun, seulement 5% de la production mondiale.

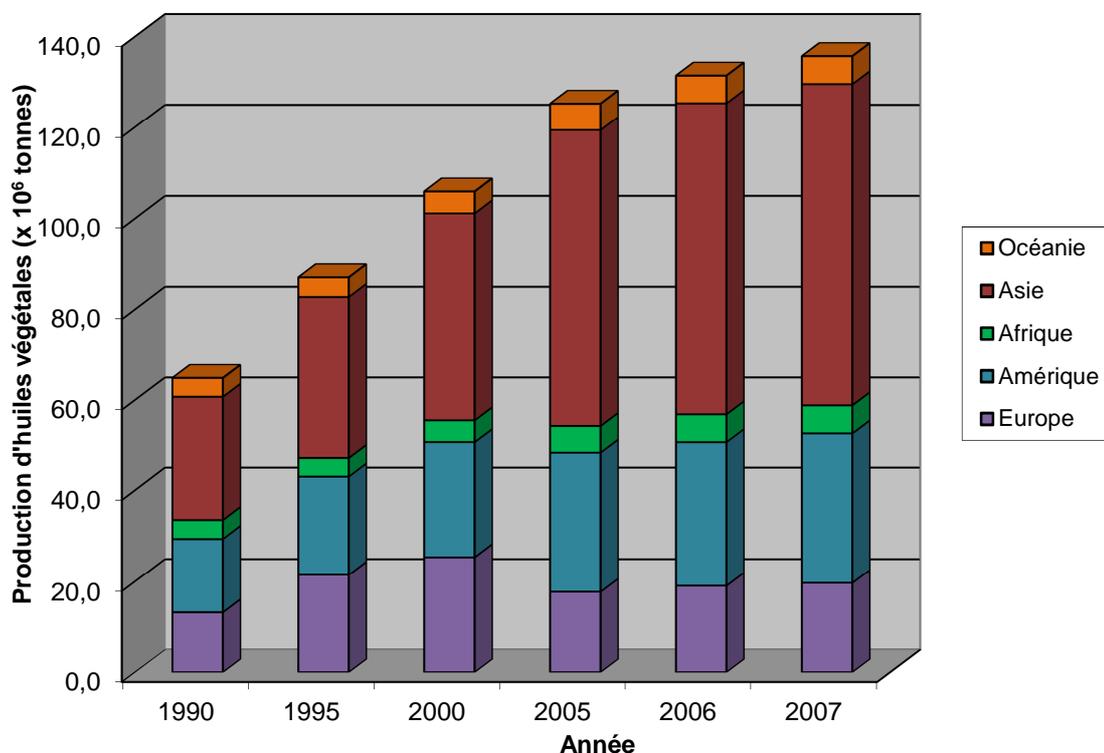


Figure I.2-1 : Production mondiale ( $\times 10^6$  tonnes) d’huiles végétales selon les continents entre 1990 et 2007<sup>[23]</sup>.

La majorité des huiles végétales est produite avec seulement 4 cultures spécifiques (le palme, le soja, le colza et le tournesol) qui représentent environ 79% de la production totale. Seuls 14% des huiles et graisses sont estimés être utilisés dans des procédés industriels selon Dyer et coll., 2008<sup>[24]</sup>, le reste n’étant pas transformé.

## I.2.2 Les principaux constituants des huiles végétales.

### I.2.2.1 Triglycérides et composition en acides gras.

Les huiles végétales représentent une importante ressource renouvelable de la nature. Les acides gras les composants peuvent être présents dans les huiles sous forme libre, ou estérifiés à un squelette carboné de glycérol formant ainsi les monoacylglycérols (MAG), diacylglycérols (DAG) et triacylglycérols (TAG). Les TAG (Figure I.2-2) représentent de 95% à 98% des huiles végétales, les 2 à 5% restants correspondant à des composés mineurs (voir sections suivantes)<sup>[25]</sup>.

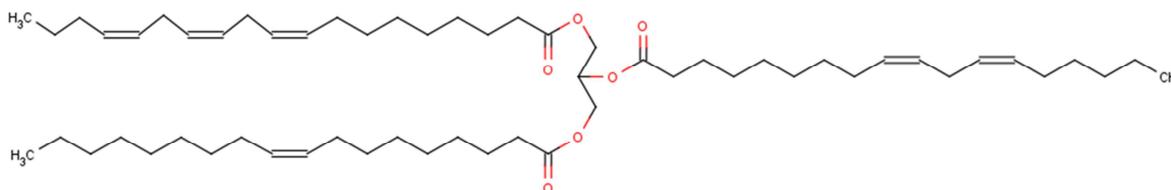


Figure I.2-2 : Représentation schématique d’un triacylglycérol, portant un résidu d’acide oléique (C18 :1<sup>Δ9</sup>) en position 1, un résidu d’acide linoléique (C18 :2<sup>Δ9,12</sup>) en position 2 et un résidu d’acide linoléique (C18 :3<sup>Δ9,12,15</sup>) en position 3.

Les acides gras diffèrent entre eux par :

- le nombre d’atomes de carbone composant la chaîne carbonée. Les acides gras naturels les plus représentés contiennent de 6 à 26 carbones. Les acides gras contenant 18 carbones sont les plus rencontrés dans les huiles végétales.
- Le nombre de doubles liaisons dans la chaîne carbonée.
- La configuration *cis* ou *trans* de la (des) double(s) liaison(s).

- La présence de groupements sur la chaîne carbonée (fonction hydroxyl ou époxy-).

Une grande variabilité dans la composition en acides gras est constatée intra-espèce, inter-espèce et même selon le cultivar. Néanmoins de grandes tendances peuvent être dégagées (Table I.2-1).

**Table I.2-1: Composition moyenne en acide gras (% mol) de quelques huiles végétales d’importance industrielle.**

Ac. gras Huile	Palmitique 16:0	Palmitoléique 16:1	Margarique 17:0	Stéarique 18:0	Oléique 18:1	Linoléique 18:2	Linoléinique 18:3	Gadoléique 20:1
Arachide	8-13	< 0,3	< 0,1	3-4	48-66	14-28	< 0,3	1-2
Colza	1-5	< 1	--	1-2	55-62	18-22	8-10	1-2
Maïs	8-13	< 1	--	1-4	24-32	55-62	< 2	< 0,5
Noisette	5-9	< 0,3	--	1-4	66-83	8-25	< 0,6	--
Noix	6-8	< 0,2	< 0,1	1-3	14-21	54-65	9-15	< 0,3
Olive	8-14	< 1	< 0,2	3-6	61-80	3-14	< 1	< 0,4
Pépin de raisin	7-10	< 0,5	--	3-6	14-22	65-73	< 0,5	< 0,2
Soja	8-13	< 0,2	--	2-5	17-26	50-62	4-10	< 0,4
Tournesol	5-7	< 0,4	< 0,1	4-6	15-25	62-70	< 0,2	< 0,5
Tournesol Oléique	3-4	< 0,1	--	3-4	75-83	10-21	< 0,3	0,1-0,5

Dubois et coll., 2007 <sup>[26]</sup> ont réalisé l’analyse de 80 huiles végétales et ont proposé une classification selon la teneur et la composition en acides gras en 3 grands groupes (Table I.2-2), chacun pouvant être sous-divisé selon la prédominance de tel ou tel acide gras:

- Les huiles saturées
- Les huiles mono-insaturées
- Les huiles poly-insaturées.

**Table I.2-2: Classification des huiles selon leur teneur en acides gras majoritaires<sup>[26]</sup>.** AC : Acide Caprique ; ALR : Acide Laurique ; AM : Acide Myristique ; AS : Acide Stéarique ; AGS : Acides Gras Saturés ; AGMI : Acide Gras Mono-Insaturés ; AGPI : Acides Gras Poly-Insaturés ; AL : Acide Linoléique ; AAL : Acide  $\alpha$ -Linoléique.

Classes d’huiles	Sous-classes	Exemples	Total AGS (%)	Total AGMI (%)	Total AGPI (%)
<b>Saturées</b>	AC	Cuphea	91,6	0,0	8,2
	ALR + AM	Coco	92,6	6,1	1,9
		Palmiste	81,9	16,4	3,1
	AP	Palme	50,4	39,4	10,5
	AS	Beurre de Cacao	62,9	34,1	3,0
Beurre de karité		46,5	48,0	5,4	
<b>Mono-insaturées</b>	AGMI	Olive	15,3	73,8	10,0
		Noisette	7,8	83,1	9,0
		Avocat	16,4	67,8	15,2
		Abricot noyau	4,8	66,4	28,8
		Colza	8,0	62,4	31,5
		Moutarde blanche	3,4	68,5	21,4
	AGMI + AGS + AL	Arachide	18,3	49,6	30,8
		Son de riz	21,3	42,4	35,9
		Argan	17,8	35,9	35,8
	<b>Poly-insaturées</b>	AL	Pépin de raisin	6,7	18,4
Carthame			9,1	13,9	77,3
Cassis			8,3	16,3	75,3
AL + AGS		Coton	27,8	18,2	53,4
		Noix	14,8	0,4	84,0
		Lupin	26,4	17,4	55,8
AL + AGMI		Tournesol	12,8	22,4	66,0
		Maïs	14,8	28,1	57,1
		Sésame	15,7	40,1	45,7
		Bourrache	16,6	26,1	60,9
		Soja	15,7	24,2	59,8
		Chanvre	10,1	12,1	79,1
AAL + AGMI		Cameline	9,7	32,8	54,1
		Lin	10,0	18,5	71,8
AAL + AL		Pourpier	21,7	11,8	66,5
	Framboise	3,7	12,0	83,6	

Une centaine d’acides gras naturels a été identifiée jusqu’à présent. Leurs combinaisons dans les TAG, leurs positions stéréochimiques *sn-1*, *sn-2* ou *sn-3* sur le squelette de glycérol, la configuration optique R/S du triglycéride estérifié en *sn-1* et *sn-3* par des acides gras différents (isomères optiques) entraînent une complexité énorme des TAG. A titre, d’exemple,

Lisa et Holcapek, 2008<sup>[27]</sup> réalisent l’analyse des TAG issus de 26 huiles industriellement importantes. Ils identifient 28 acides gras différents donnant lieu à 264 TAG différents.

Comme l’illustre la Table I.2-3 pour les acides gras majeurs<sup>[28]</sup>, les acides gras saturés ont tendance à se positionner majoritairement en position *sn-1* et *sn-3* du squelette de glycérol. Au contraire les acides gras (poly-)insaturés se retrouvent majoritairement en position *sn-2* (à l’exception de l’huile de soja dans laquelle l’acide linoléique se positionne en positions *sn-1* et *sn-3*). Concernant les acides gras mono-insaturés, l’acide oléique ((C18 :1) est distribué assez régulièrement, mais les acides gras plus longs tels que l’acide érucique (C22 :1) et l’acide eicosénoïque (C20 :1) sont clairement plus abondants sur les positions externes.

**Table I.2-3: Distribution positionnelle des acides gras majeurs dans les triglycérides de certaines huiles végétales (%mol)<sup>[28]</sup>.**

Huile	sn	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0
Lin	1	10,1	0,2	5,6	15,3	15,6	53,2					
	2	1,6	0,1	0,7	16,3	21,3	59,8					
	3	6	0,3	4	17	13,2	59,4					
Soja	1	18,2	0,1	5,4	15,9	47,8	12,9					
	2	1,9	0,1	2,7	28,4	64,1	2,6					
	3	12	0,1	4,5	25	48,3	10,3					
Mais	1	17,9	0,3	3,2	27,5	49,8	1,2					
	2	2,3	0,1	0,2	26,5	70,3	0,7					
	3	13,5	0,1	2,8	30,6	51,6	1					
Arachide	1	13,6	0,3	4,6	59,2	18,5		0,7	1,1	1,3		0,7
	2	1,6	0,1	0,3	58,5	38,6			0,3	0,2		0,5
	3	11	0,3	5,1	57,3	10		4	2,7	5,7		2,8
Tournesol	1	10,9	0,6	1,9	17,1	70						
	2	1,7	0	4,1	36,3	57,8						
	3	9	0,5	8,7	31,2	51,3						
Olive	1	13,1	0,9	2,6	71,8	9,8	0,6					
	2	1,4	0,7		82,9	14	0,8					
	3	16,9	0,8	4,2	73,9	5,1	1,3					
Colza	1	4,1	0,3	2,2	23,1	11,1	6,4		16,4	1,4	34,9	
	2	0,6	0,2		37,3	36,1	20,3		2		3,6	
	3	4,3	0,3	3	16,6	4	2,6		17,3	1,2	51	

### I.2.2.2 Les composants mineurs.

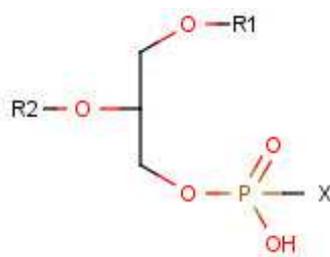
Selon leur mode d’obtention, les huiles sont disponibles sous trois formes différentes :

- Les huiles vierges répondent à des critères précis fixés par la réglementation: extraction par des procédés exclusivement mécaniques, sans solvant ; clarification par des moyens physiques (décantation et double filtration) ; aucun traitement de raffinage physique ou chimique.
- Les huiles brutes : le terme d’huile brute est utilisé pour toute huile obtenue en sortie d’extraction, quel que soit le mode d’obtention (mécanique ou avec solvant).
- Les huiles raffinées sont obtenues après un processus de raffinage qui sera abordé plus en détail dans la section I.2.3.

#### I.2.2.2.1 Les composés phosphorylés.

Les composés phosphorylés sont représentés par des grands groupes de molécules différant par la nature de leur squelette carboné :

- les phosphoglycérides sont composés d’un acide phosphorique (un phosphate estérifié en position *sn*-3 d’une molécule de glycérol) dont les positions *sn*-1 et *sn*-2 sont estérifiées de résidus d’acides gras R1 et R2 variables (Figure I.2-3). Le résidu X peut être une base azotée (aminoalcool) ou un polyol<sup>[29]</sup>.



**Figure I.2-3 : Représentation schématique de la formule générale des phosphoglycérides.** R1 et R2 sont des résidus d’acides gras, X est une base azotée (aminoalcool) ou un polyol.

Les Phosphoglycérides les plus courants sont la phosphatidylsérine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylcholine, le phosphatidylglycérol et le phosphatidylinositol.

- Les sphingophospholipides sont basés sur un squelette sphingosyl<sup>[29]</sup>. Le phospholipide le plus commun dans cette classe est un ester de phosphoryl-choline et de N acyl-sphingosine. Il est communément appelé sphingomyéline (Figure I.2-4). Les sphingophospholipides sont des composés très minoritaires dans les huiles végétales.

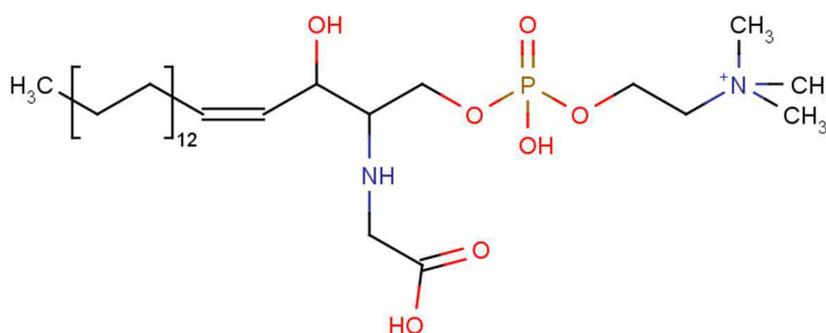
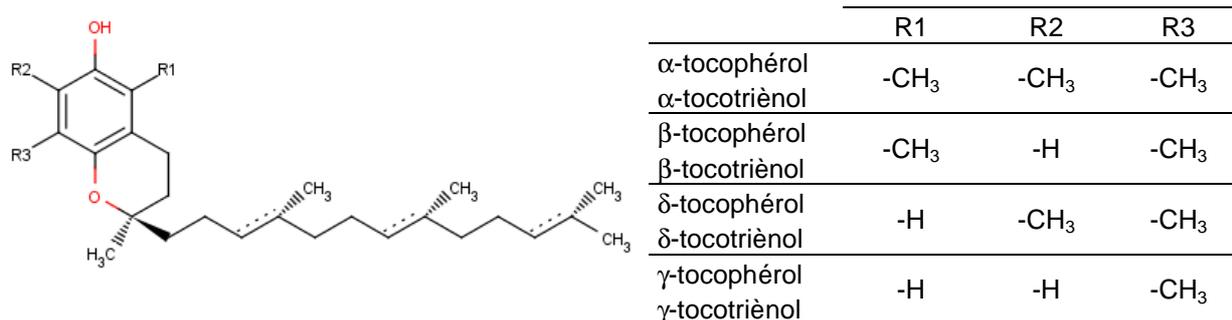


Figure I.2-4 : Représentation schématique de la formule générale de la sphingomyéline.

#### I.2.2.2.2 Les Tocophérols et Tocotriénols.

Les tocophérols sont des éléments abondants des huiles. Ils sont constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone (Figure I.2-5). Les tocotriénols diffèrent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons (indiquées en pointillés dans la Figure I.2-5) sur cette chaîne latérale. Les tocophérols et tocotriénols sont présents sous trois formes,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , et  $\gamma$ . La différence réside dans le nombre et la position des groupements méthyles sur le noyau chromanol. Leur configuration est tout R. Ils forment le groupe de la Vitamine E.



**Figure I.2-5 : Structure des Tocophérols et Tocotriénols. Les doubles liaisons indiquées en pointillé ne sont présentes que dans les tocotriénols.**

La composition et la teneur en tocophérols et tocotriénols varient énormément entre les espèces et selon le cultivar. Cependant, de grandes tendances peuvent être soulignées. Un récapitulatif de la composition et de la teneur de certaines huiles végétales est présenté dans la Table I.2-4.

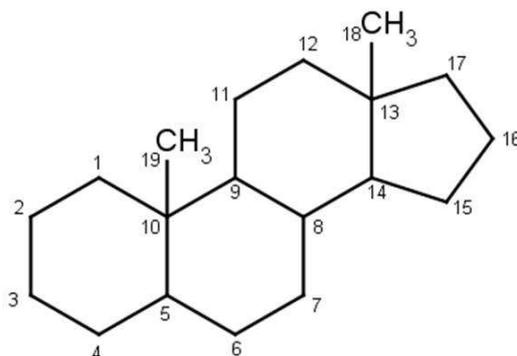
L’ $\alpha$ -tocophérol est le plus représenté des tocophérols dans certaines huiles, en particulier chez le tournesol, le carthame, le germe de blé et le canola. D’autres huiles contiennent une plus grande quantité de  $\gamma$ -tocophérol (palme, soja, colza, maïs, arachide, sésame). Le germe de blé contient une quantité appréciable de  $\beta$ -tocophérol et de  $\beta$ -tocotriénol. La palme est riche en  $\alpha$ -tocotriénol, les tocotriénols étant peu représentés par ailleurs. Les huiles de coco et d’olive ne contiennent de tocophérols que très modestement.

**Table I.2-4: Teneur en tocophérols d’huiles végétales (mg/kg) <sup>[30, 31]</sup>.**

	Tocophérols				Tocotriénols	
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\alpha$	$\beta$
Canola	210	1	42	0,4	0,4	-
Coco	5	-	-	6	5	1
Maïs	112	50	602	18	-	-
Coton	389	-	387	-	-	-
Olive	119	-	7	-	-	-
Palm	256	-	316	70	146	32
Arachide	130	-	214	21	-	-
Carthame	342	-	71	-	-	-
Sésame	136	-	290	-	-	-
Soja	75	15	797	266	2	-
Tournesol	487	-	51	8	-	-
Germe de blé	1330	710	260	271	26	181
Colza	190	-	500	15	-	-

### I.2.2.2.3 Les Stérols.

Les stérols représentent la plus grande partie insaponifiable des huiles végétales. Leur structure repose sur le noyau dit cyclopentanophénanthrène (encore appelé noyau stérane). C’est une structure cyclique à 19 carbones et dont les carbones C5 C8 C9 C10 C13 C14 sont asymétriques (Figure I.2-6).



**Figure I.2-6 : représentation du noyau cyclopentanophénanthrène, motif de base des stérols.**

Les stérols diffèrent les uns des autres par la nature et la position de groupement porté par ce cycle et notamment la chaîne latérale portée par le carbone 17 et par la présence éventuelle et le nombre de doubles liaisons. Plus de 250 stérols naturels ont été isolés du monde végétal [28]. Nous pouvons citer le  $\beta$ -sitostérol, le campestérol, l’ergostérol, le fucostérol et le brassicastérol comme étant les plus courants. Leur structure est présentée dans la Figure I.2-7.

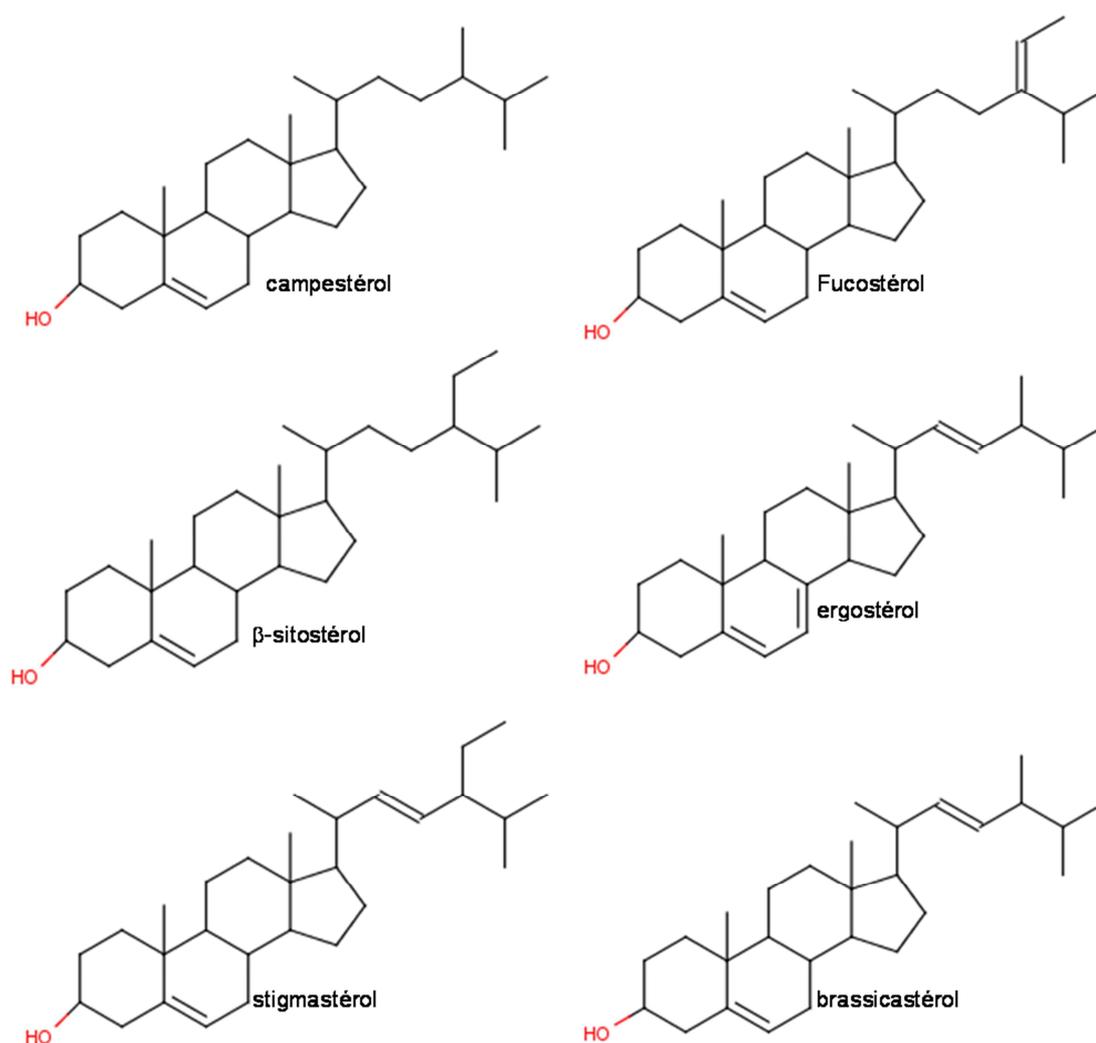


Figure I.2-7 : Représentation schématique de phytostérols courants.

Les stérols se trouvent dans les huiles sous forme libre ou sous forme estérifiée avec des acides gras. La nature des acides gras est différente selon les huiles. La teneur, la composition et le degré d’estérification des stérols dépendent de nombreux facteurs tels que :

- les espèces génétiques
- le cultivar
- les conditions de stockage des huiles
- le procédé de raffinage.

Verleyen et coll, 2002<sup>[32]</sup> donnent la teneur en stérols d’une liste non exhaustive d’huiles d’intérêt industriel. La Figure I.2-8 démontre la variabilité de teneur en stérols des huiles pouvant aller de 65 mg/100g pour l’huile de palme jusqu’à 900 mg/100g dans l’huile de maïs. L’huile de tournesol en contient environ 300mg/100g.

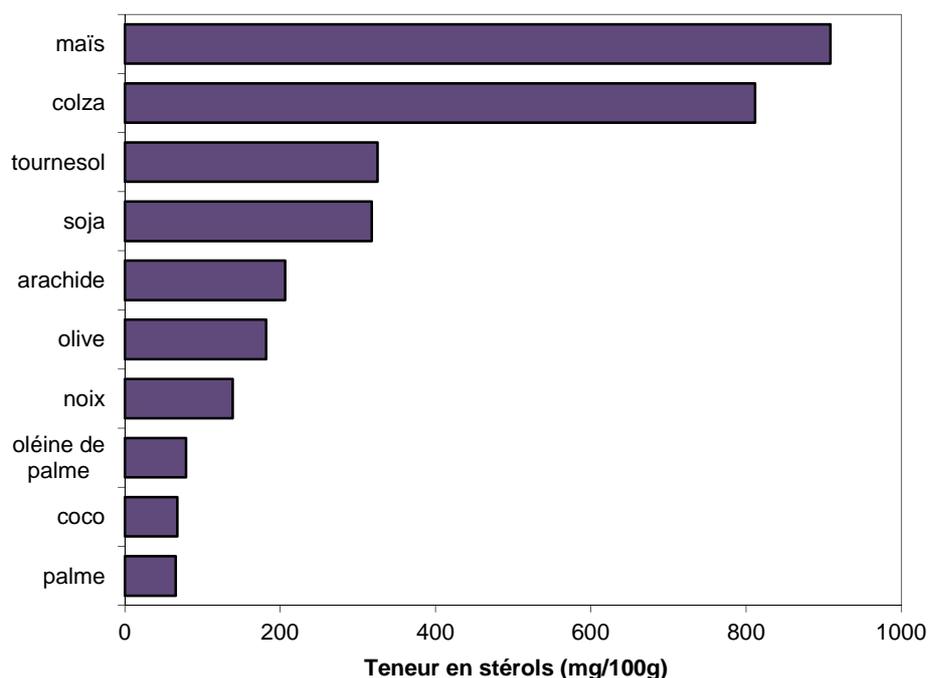


Figure I.2-8 : Teneur en stérols totaux (mg/100g) de quelques huiles d’intérêt industriel<sup>[32]</sup>. THO = Tournesol Hautement Oléique.

Le taux d’estérification des stérols est également très variable selon les huiles (Figure I.2-9). Les stérols estérifiés peuvent représenter jusqu’à 84% dans l’huile d’olive tandis qu’ils ne représentent que 41% dans l’huile de colza et 60% dans l’huile de tournesol.

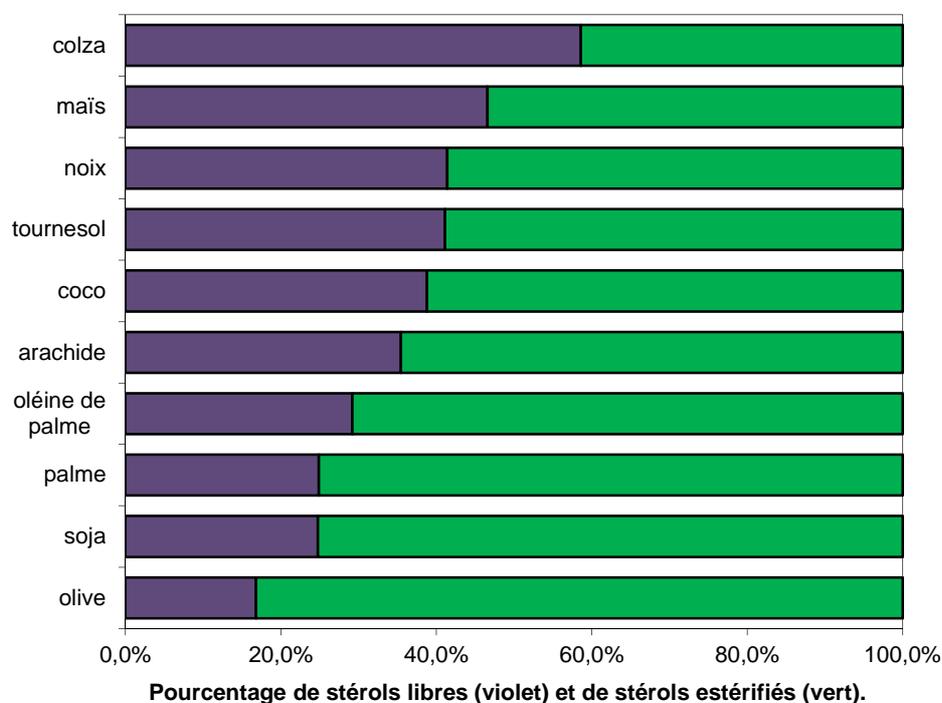


Figure I.2-9 : Comparaison entre la teneur en stérols libres (mg/100g) (violet) et la teneur en stérols estérifiés (vert) de quelques huiles d’intérêt industriel<sup>[32]</sup>.

Phillips et coll, 2001<sup>[33]</sup> ont analysé les stérols de 45 huiles différentes. La Table I.2-5 donne un résumé des teneurs des principaux phytostérols de certaines huiles d’intérêt industriel. On observe une large variation dans la teneur et la composition des différentes huiles végétales. La classe de stérols prédominante est celle du  $\beta$ -sitostérol qui représente 73% dans le tournesol ou même jusqu’à 88% des stérols dans l’huile de coton.

Table I.2-5: Composition en stérols (mg/100g) d’huiles d’intérêt industriel<sup>[33]</sup>.

	sitostérol	campestérol	stigmastérol	brassicastérol	$\Delta^5$ - Avenastérol
Canola	381	164	16	51	18
Colza	393	275	3	69	36
Maïs	509	139	59	41	11
Soja	158	55	60	1	5
Carthame	121	28	15	0	18
Arachide	115	24	12	1	13
Sesame	331	75	33	0	51
Olive	129	4	2	17	3
Coton	256	20	5	0	8
Palme	40	15	9	0	2
Onagre	862	71	4	0	121
Bourrache	108	84	9	0	76
Tournesol	245	34	32	0	25

#### I.2.2.2.4 Composés phénoliques.

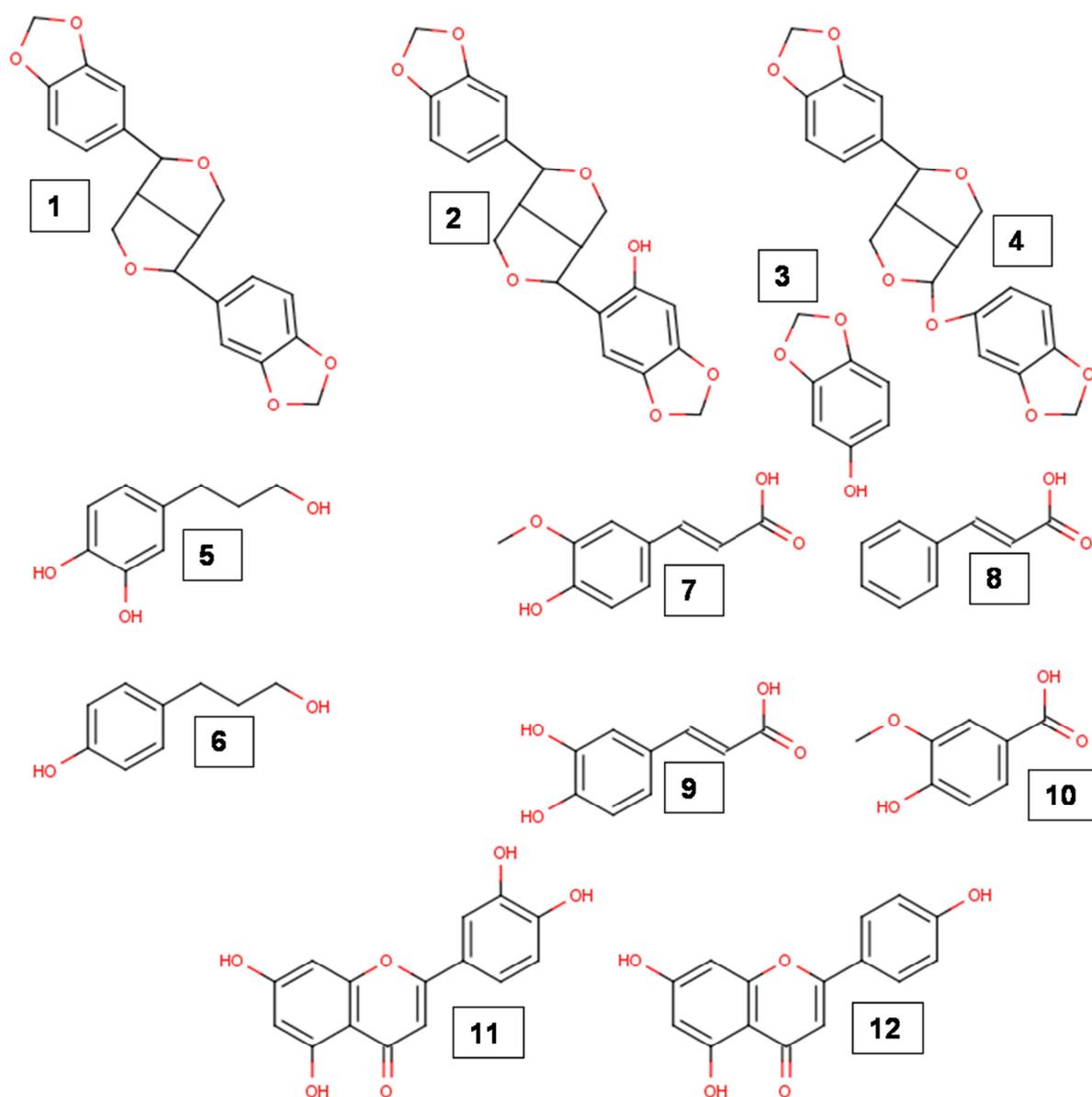
De nombreux composés phénoliques secondaires sont présents dans les huiles. Leur diversité et leur nombre sont très importants. Ces derniers participent aux propriétés de stabilité oxydative hors norme des huiles de sésame et des huiles d’olive. Les composés phénoliques sont nombreux et de natures différentes<sup>[34]</sup>. Sont présentées dans la Figure I.2-10 les structures de différents composés phénoliques :

- les lignanes sont des composés phénoliques formés de deux unités monolignols. Il existe de très nombreux lignanes, qui diffèrent par le type de liaison entre les deux unités et les modifications qui interviennent après la dimérisation (Figure I.2-10). les lignanes se retrouvent surtout dans les huiles de sésame et de lin.
- les alcools phénoliques, tels que le tyrosol ou l’hydrotyrosol, sont essentiellement présents dans les huiles d’olive.

- 
- les acides phénoliques, tels que l’acide caféique, l’acide vanillique, les acides *para*- et *ortho*-coumarique, l’acide férullique ou l’acide cinnamique, sont essentiellement présents dans les huiles d’olive.
  - Les flavones qui dérivent d’une structure phénylbenzopyrone.

La pluralité des composés phénoliques dans les huiles résulte souvent en des mélanges très complexes.

Les composés phénoliques ont été identifiés dans de nombreuses huiles. La teneur relative de chaque composé phénolique est très dépendante de l’espèce végétale et du cultivar. La teneur en composés phénoliques de l’huile d’olive est de l’ordre de 250 à 300 mg/kg<sup>[35]</sup> et sont essentiellement des phénols simples (hydroxytyrosol and tyrosol). L’huile de sésame contient de grandes quantités de sésamine et de sésamoline (de 200 à 400 mg/100g) pouvant se décomposer en sésamol et sésaminol<sup>[36]</sup>. Il est reconnu que la graine de tournesol contient de grandes quantités de composés phénoliques (2 à 3 g/100g de graines), essentiellement constitués d’acide caféique<sup>[37]</sup>, Cependant, ils ne sont retrouvés qu’à l’état de traces dans les huiles<sup>[38]</sup>.



**Figure I.2-10 : Représentation schématique des structures de polyphénols présents dans les huiles végétales.** 1 à 4 : Lignanes ; 5 & 6 : Alcools phénoliques ; 7 à 10 : Acides phénoliques ; 11 & 12 : Flavones. 1 : Sésamine, 2 : Sésaminol, 3 : Sésamol, 4 : Sésamolone, 5 : Hydrotyrosol, 6 : Tyrosol, 7 : Acide férullique, 8 : Acide cinnamique, 9 : Acide caféique, 10 : Acide vanillique ; 11 : Lutéoline ; 12 : Apigénine.

---

#### I.2.2.2.5 Autres composés.

Un certain nombre de composés mineurs supplémentaires sont contenus dans les huiles végétales. Peuvent être cités :

- des hydrocarbures. Le plus couramment rencontré est le squalène, un hydrocarbure terpénoïde à 6 motifs d’isoprène. Il peut atteindre des quantités non négligeables dans l’huile d’olive et représenter jusqu’à 40% de la fraction insaponifiable (800 à 1200 mg/kg)<sup>[25]</sup>. Le squalène est également présent en quantité dans les huiles d’argan, d’amarante, de son de riz ou de germe de blé. De faibles quantités de squalène sont rencontrées dans les huiles de tournesol (de l’ordre de 6 mg/100g)<sup>[39]</sup>. Des alcanes de C8 à C35 peuvent être également présents.
- des pigments chlorophylliens et leurs dérivés (phéophytines) responsables de la coloration verte des huiles de canola, colza et olive par exemple. L’absence de chlorophylles et dérivés est devenue un critère de qualité de certaines huiles<sup>[25, 40]</sup>.
- Des caroténoïdes et plus spécialement le  $\beta$ -carotène et la lutéine. La concentration des caroténoïdes est souvent faible dans les huiles végétales mais leur présence est cruciale dans le processus de stabilité oxydative (voir section I.2.4.3). Les huiles de colza et de lin en contiennent de 30 à 40 ppm. L’huile d’olive peut contenir 30 à 31 ppm de chacun des pigments<sup>[41]</sup>.
- Des cires, esters d’acides gras (de 20 à 28 atomes de carbone) et d’alcool gras à chaîne longue (de 22 à 30 atomes de carbone) et des alcools gras<sup>[25]</sup>. La teneur en cire peut être importante dans les huiles de maïs, de son de riz, de carthame, de sésame et de tournesol : de 0,2 à 3% selon Jonhson, 2008<sup>[42]</sup>.
- Des traces de métaux, provenant des sols et des fertilisants ou issus de contamination due à la transformation et au stockage. Les métaux les plus fréquemment rencontrés sont Fer et Cuivre<sup>[34]</sup>. La Table I.2-6 donne des valeurs de leur présence dans les

huiles végétales. Cr, Mn, Sn, Ni et Pb peuvent être rencontrés mais à des concentrations n’excédant pas le  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[43]</sup>.

- Des protéines résiduelles.

**Table I.2-6: Teneur en métaux de quelques huiles d’intérêts**<sup>[43]</sup>.

	Teneur en métaux	
	Cuivre (ppb)	Fer (ppm)
Sésame	16	1,2
Soja brut	13,2	2,8
Olive vierge	9,8	0,7
Tournesol	5,2	0,3

### **I.2.3 Raffinage des huiles**

La plupart des huiles sont utilisées sous une forme dite raffinée dans laquelle nombre de composés ‘‘non TAG’’ sont éliminés au travers d’opération de raffinage. Ces composés indésirables incluent de petites quantités de protéines et autres solides résiduels issus du procédé d’extraction : les phospholipides, les cires, les composés soufrés (huile de colza), éventuellement des traces de solvants résiduels et de l’eau. Cependant tous les composés mineurs ne sont pas délétères. Par exemple, les tocophérols qui protègent les huiles contre l’auto-oxydation, les  $\beta$ -carotènes et autres composés phénoliques agissant en tant qu’anti-oxydant sont à conserver. Malheureusement, des étapes du processus de raffinage ne sont pas parfaitement sélectives et éliminent certains des composés bénéfiques au même titre que les indésirables ciblés<sup>[44]</sup>.

---

De nombreux procédés de raffinage des huiles ont été développés au cours du temps. Le raffinage chimique et le raffinage physique sont les deux types majeurs de raffinage des huiles végétales. Des procédés impliquant des enzymes ou alors des membranes ont été également développés. Néanmoins, le raffinage chimique reste le procédé le plus utilisé.

#### I.2.3.1 Le raffinage chimique

La Figure I.2-11 présente l’organigramme général du raffinage chimique des huiles végétales brutes<sup>[45]</sup>.

La première étape du raffinage implique le retrait des phospholipides grâce à une étape dite de ‘‘dégommage’’. Son principe est d’éliminer les phospholipides grâce à un lavage à l’eau. L’hydratation des phospholipides les rend insolubles dans l’huile et facilement éliminables par précipitation. Les gommes sont rendues insolubles dans l’huile avec un taux d’hydratation de 1% à 3%. Une règle générale est que la quantité d’eau à utiliser doit être équivalente à la quantité de phospholipides hydratables contenus dans l’huile<sup>[44]</sup>.

Les phospholipides sont présents sous une forme hydratante et sous une forme non-hydratable (i.e. combinés avec des cations calcium, magnésium ...). Ces derniers sont traités avec des solutions acides (acide phosphorique de 0,02% à 0,5% à 60°C-90°C pendant 15-30 minutes) afin de les rendre hydratables<sup>[46]</sup>.

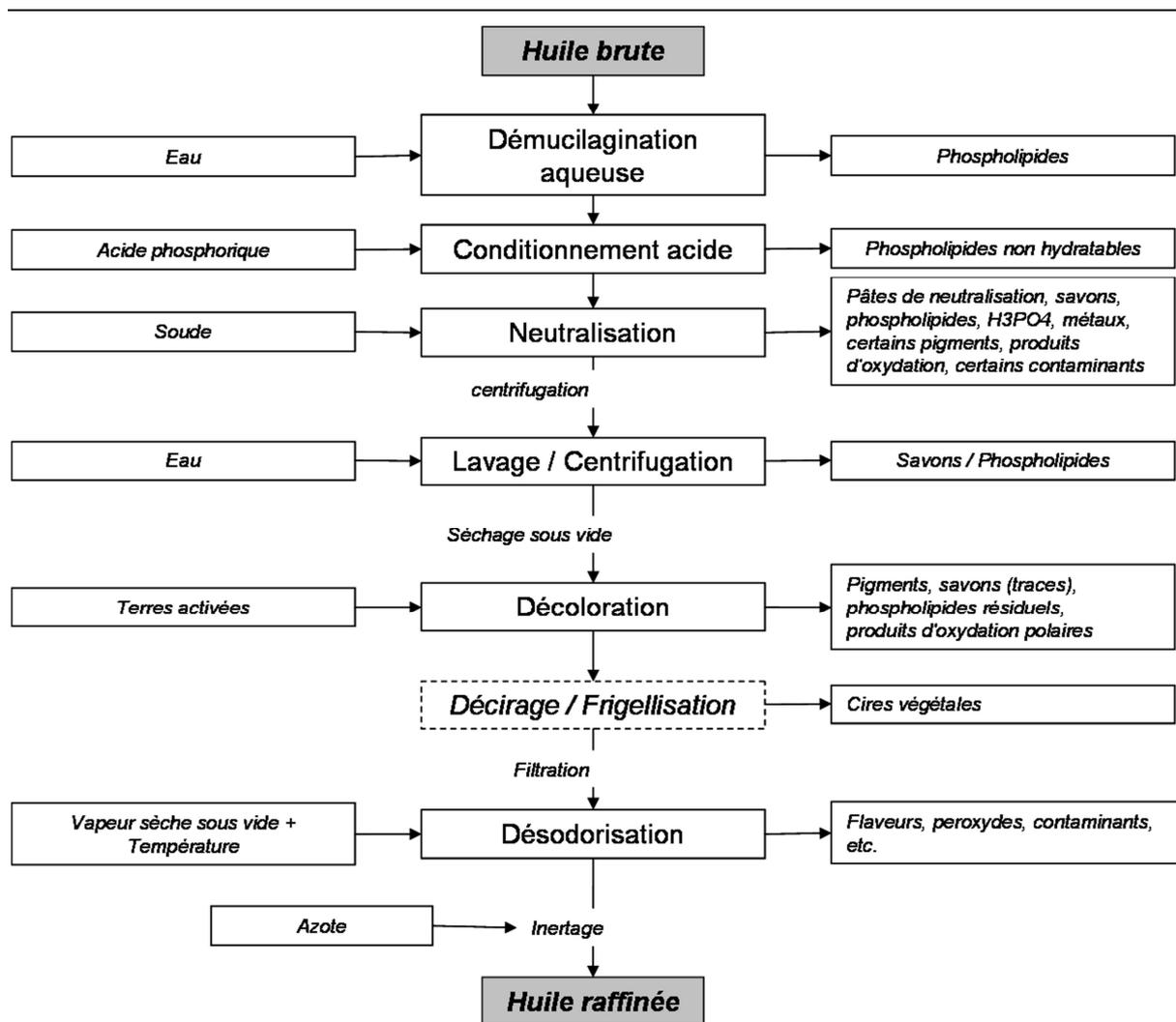


Figure I.2-11 : Diagramme des opérations élémentaires du raffinage chimique des huiles végétales<sup>[45]</sup>.

L'étape de neutralisation consiste en un apport de soude afin de saponifier les acides gras et neutraliser le possible excès d'acide phosphorique utilisé lors de l'étape précédente. Les savons sont alors éliminés de façon continue par centrifugation. La quantité et la force de la soude utilisée sont dépendantes de la quantité d'acides gras libres présents dans les huiles. Les excès de soude peuvent conduire à la saponification des triglycérides et réduire les rendements de raffinage. L'indice d'acide des huiles est donc déterminé avant neutralisation. La neutralisation en présence d'hexane est connue sous le nom de raffinage sur miscella. Cela permet une réduction de viscosité et une augmentation de la différence de densité entre les

---

deux phases huile/ solvant et eau/savon. Cela permet d’augmenter l’efficacité de séparation et de réduire les pertes de raffinage. Ce procédé induit simultanément une décoloration de l’huile. Le principal inconvénient est le recyclage des solvants utilisés qui en font un procédé relativement cher. Une étape de lavage à l’eau (10 à 20%) est effectuée pour retirer la grande majorité des savons produits lors de l’étape de neutralisation. Les savons résiduels pouvant persister sont éliminés lors de l’étape de décoloration.

La saturation en eau des huiles est en moyenne de 0,8%. Cependant, les huiles végétales doivent être séchées pour éviter des hydrolyses parasites aboutissant à la formation d’acides gras libres lors d’utilisation des huiles à hautes températures (désodorisation par exemple). Pour ce faire, les huiles végétales sont traitées à chaud (90°C – 115°C) et sous vide poussé (15mm Hg absolu). L’humidité relative des huiles dégommées et neutralisées est ainsi abaissée à moins de 0,1%.

Une étape de décirage peut être nécessaire pour les huiles fortement chargées en cire (maïs, son de riz, carthame, sésame et tournesol surtout). Traditionnellement, le décirage consiste en un refroidissement continu des huiles à 4-6°C pour cristalliser les cires. La durée de la cristallisation est de 4h et peut être prolongée par une période de 6h pour développer les cristaux de cires. L’huile est alors chauffée à 16°C avant d’être filtrée pour séparer les cristaux de l’huile.

La décoloration a pour but d’optimiser la couleur des huiles en éliminant les pigments avec des argiles neutres, des terres activées, des silicates synthétiques, du gel de silice ou encore du charbon. Un bénéfice associé à la décoloration est la décomposition des peroxydes et l’élimination des dernières traces de savons formés dans les étapes précédentes. Le procédé

---

est généralement conduit sous vide car les décolorants usuels peuvent catalyser l’oxydation des huiles en présence d’air. Les pigments sont adsorbés à la surface des terres ou argiles lors de la mise en contact avec les huiles puis sont éliminés par filtration.

La dernière étape du raffinage chimique est la désodorisation. Son but est d’éliminer les derniers contaminants des huiles tels que les acides gras volatils ou les aldéhydes responsables des odeurs des huiles. Le principe de la désodorisation est un entraînement par la vapeur à haute température (180°C-240°C) sous vide. La désodorisation a également pour effet secondaire de réduire les traces de solvants résiduels et les traces de pesticides. Elle permet l’élimination de la plupart des peroxydes pouvant être contenus dans les huiles mais ne permet pas de récupérer celles dont le stade d’oxydation est trop avancé (rancissement complet).

Les huiles vierges et brutes possèdent généralement une stabilité oxydative plus importante que les huiles raffinées (perte d’antioxydants). Ainsi, les huiles raffinées ne sont pas exposées à l’atmosphère mais sont conservées sous atmosphère d’azote inerte.

Le raffinage chimique, s’il est largement utilisé, a un certain nombre de désavantages<sup>[47]</sup> :

- la procédure est assez coûteuse.
- la perte par saponification des triglycérides peut être élevée, spécialement pour les huiles à haute teneur en acides gras libres, grandes consommatrices de soude.
- La procédure demande beaucoup de temps.
- De grandes quantités d’énergie sont consommées.
- Les déchets liés aux différentes étapes doivent être traités.

Pour ces raisons, des voies alternatives de raffinage ont été développées.

---

### I.2.3.2 Raffinage physique.

Lors du raffinage physique des huiles, les acides gras libres contenus dans les huiles brutes sont éliminés par des méthodes physiques, sans application de solution de soude. Néanmoins, même dans les procédés de raffinage physique, sont incluses des étapes faisant intervenir des produits chimiques nécessaires pour assurer les purifications non réalisées physiquement (dégommage, décoloration etc...).

La Table I.2-7 suivante propose une vue d’ensemble des procédés de raffinage physique. Le raffinage par entraînement à la vapeur est le seul à être actuellement employé à un niveau industriel.

Le raffinage physique sous flux de vapeur et sous basse pression permet le retrait des acides gras libres et des substances insaponifiables tout en réduisant les pertes de triglycérides par rapport au raffinage chimique. Le raffinage physique a un certain nombre d’avantages par rapport au raffinage chimique traditionnel : simplicité de procédure, rendement de raffinage augmenté, conservation énergétique, génération de polluants environnementaux réduits. Cependant le principal inconvénient de la procédure est que toutes les huiles ne sont pas raffinables par ce procédé. L’utilisation de hautes températures et d’un vide poussé entraîne la formation de produits secondaires tels que des trans-isomères.

Table I.2-7: Méthodes de raffinage physique des huiles végétales brutes<sup>[47]</sup>.

Procédure	Principe
Raffinage à la vapeur	Retrait des acides gras libres et autres volatiles par la vapeur surchauffée à 200-270°C à basse pression suivant un dégomme et une décoloration primaire.
Entraînement par gaz inerte	Retrait des acides gras libres dans un flux de gaz inerte (azote)
Distillation moléculaire	Retrait des composés les plus volatils y compris les acides gras libres des TAG moins volatils à très basse pression sans application de vapeur.
Raffinage sur membrane	Traitement des huiles brutes sous pression avec des membranes sélectives perméables aux acides gras libres mais imperméables aux TAG
Système hermétique	Traitement de l’huile à haute température et haute pression, suivi de la centrifugation des précipitats puis d’un raffinage à la vapeur.
Extraction par solvants	Retrait sélectif des acides gras par distribution à contre courant entre solvants non miscibles, l’un dissolvant les acides gras, l’autre extrayant sélectivement les TAG
Raffinage avec CO <sub>2</sub> supercritique	Retrait des acides gras libres et autres impuretés par CO <sub>2</sub> supercritique

#### **I.2.4 Mécanisme d’oxydation des huiles et matières grasses.**

La stabilité oxydative représente la résistance à l’oxydation pendant le traitement et le stockage des huiles et dérivés. La résistance à l’oxydation peut être exprimée comme la période de temps nécessaire pour atteindre un point critique d’oxydation, représenté soit par

un changement des propriétés organoleptiques du produit, soit par une accélération soudaine du procédé oxydatif.

Différents mécanismes moléculaires, l’auto-oxydation et l’oxydation photosensible, sont à l’origine de l’oxydation des huiles pendant leur traitement et leur stockage. Deux types d’oxygènes peuvent réagir avec les huiles ; l’un est appelé ‘oxygène atmosphérique à triplet’  $^3\text{O}_2$  et est impliqué dans le phénomène d’auto-oxydation, une réaction radicalaire en chaîne. L’autre est appelé ‘oxygène à singulet’  $^1\text{O}_2$  et intervient dans le processus d’oxydation photosensible. La différence entre les deux oxygènes réside dans leurs orbitales moléculaires (Figure I.2-12). La forme la plus abondante et la plus stable est  $^3\text{O}_2$  que l’on respire quotidiennement. L’orbitale moléculaire de  $^1\text{O}_2$  diffère de celle de  $^3\text{O}_2$ , par la présence d’une paire d’électrons au niveau de l’orbitale antiliante  $\pi^*$  [34, 48].

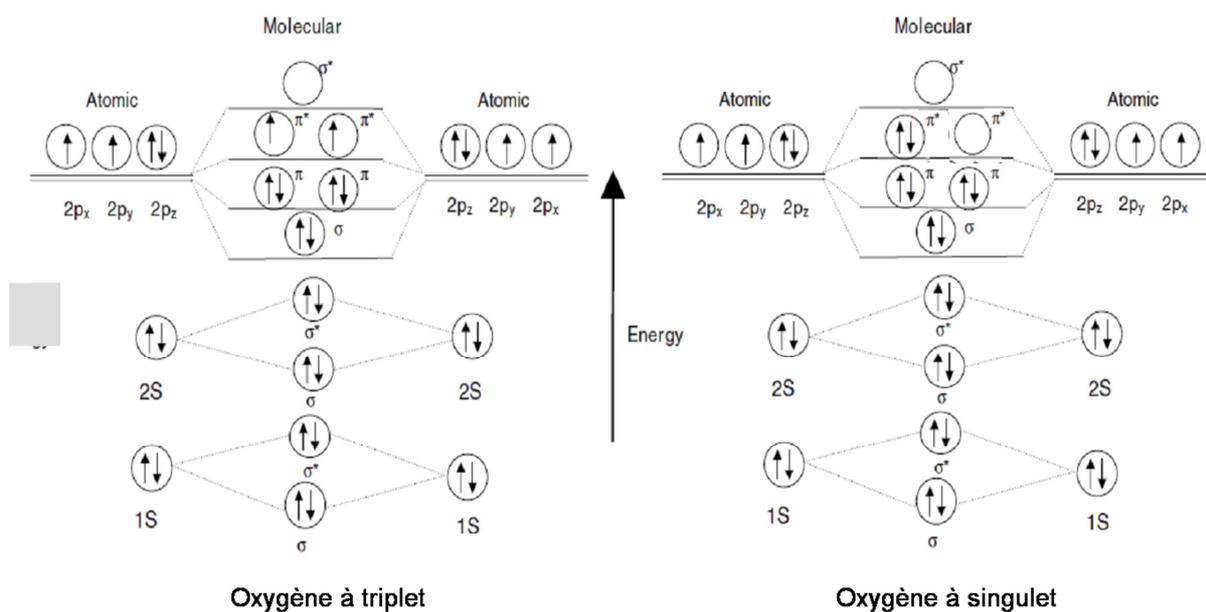
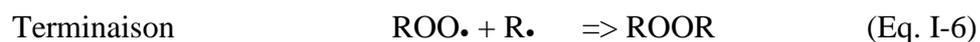
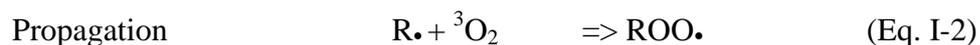


Figure I.2-12 : Orbitales moléculaires des oxygènes à triplet  $^3\text{O}_2$  et à singulet  $^1\text{O}_2$  [34, 48]

### I.2.4.1 Le mécanisme d’auto-oxydation des huiles.

L’auto-oxydation des huiles est une réaction radicalaire en chaîne. Elle se décompose en une étape d’initiation, une étape de propagation et une étape de terminaison.



(R = chaîne alkyle)

L’auto-oxydation implique que les acides gras ou acylglycérols soient sous forme radicalaire. Lors de l’étape d’initiation, un atome d’hydrogène est enlevé de la chaîne carbonée d’acide gras ou d’acylglycérol créant ainsi un radical lipidique  $\text{R}\cdot$  (réaction I-1). L’énergie nécessaire varie selon la position de l’atome d’hydrogène dans la chaîne carbonée. L’atome d’hydrogène adjacent d’une double liaison et, plus particulièrement celui lié au carbone présent entre deux doubles liaisons, est facilement enlevé (Figure I.2-13). Le processus est accéléré par les catalyseurs métalliques, par les UV et la lumière visible qui permettent la formation de radicaux libres sur les acides gras ou les acylglycérols.

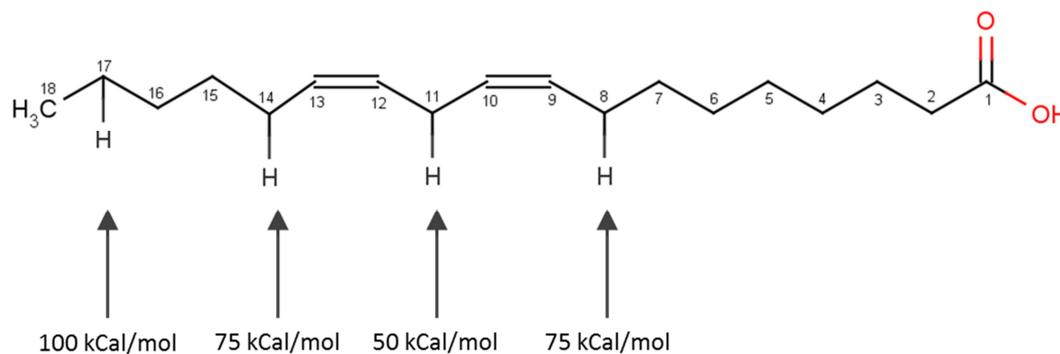


Figure I.2-13 : Energie nécessaire pour la formation d’un radical lipidique selon la position de l’hydrogène sur la chaîne carbonée de l’acide linoléique<sup>[34]</sup>.

Le radical lipidique réagit avec  $^3\text{O}_2$  et forme des radicaux peroxy-lipidiques  $\text{ROO}\cdot$  (réaction I-2). Cette réaction est très rapide sous pression en oxygène normale et par conséquent la concentration en radicaux lipidiques  $\text{R}\cdot$  est très inférieure à celle des radicaux peroxy-lipidiques  $\text{ROO}\cdot$ . Ces derniers peuvent à leur tour soustraire l’hydrogène d’une nouvelle molécule d’acide gras ou d’acylglycérol pour former un hydroperoxyde  $\text{ROOH}$  et un nouveau radical lipidique  $\text{R}\cdot$  (réaction I-3). Ces radicaux catalysent à nouveau la réaction d’oxydation : il y a alors réaction en chaîne.

Les hydroperoxydes sont des espèces peu stables qui peuvent se dissocier facilement pour produire des radicaux oxy-lipidiques  $\text{RO}\cdot$  qui accélèrent la propagation de la réaction (réactions I-4 et I-5).

La formation de radicaux peroxy-lipidiques et d’hydroperoxyde ne dépend que de la quantité et de la disponibilité de l’oxygène et de la température. Lorsque deux radicaux ( $\text{R}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$  ou  $\text{ROO}\cdot$ ) se rencontrent, des espèces non radicalaires polymériques sont produites et la réaction s’achève (réactions I-6 à I-8) : on parle de terminaison.

Les hydroperoxydes produits par auto-oxydation sont généralement stables à température ambiante et en l’absence de métaux. Dans le cas contraire, ils sont décomposés en radicaux alkoxy-, pour former des aldéhydes, cétones, esters, alcools et hydrocarbures à courtes chaînes.

#### I.2.4.2 L’oxydation photosensible.

L’oxydation des huiles est accélérée par la lumière en présence de “sensibilisateurs” tels que les chlorophylles et dérivés. Ces derniers peuvent absorber l’énergie lumineuse et passer très rapidement dans un état excité instable à singulet. Les sensibilisateurs excités peuvent retourner à leur état initial par émission de lumière (fluorescence), par conversion interne (émission de chaleur) ou par croisement inter-système CIS.

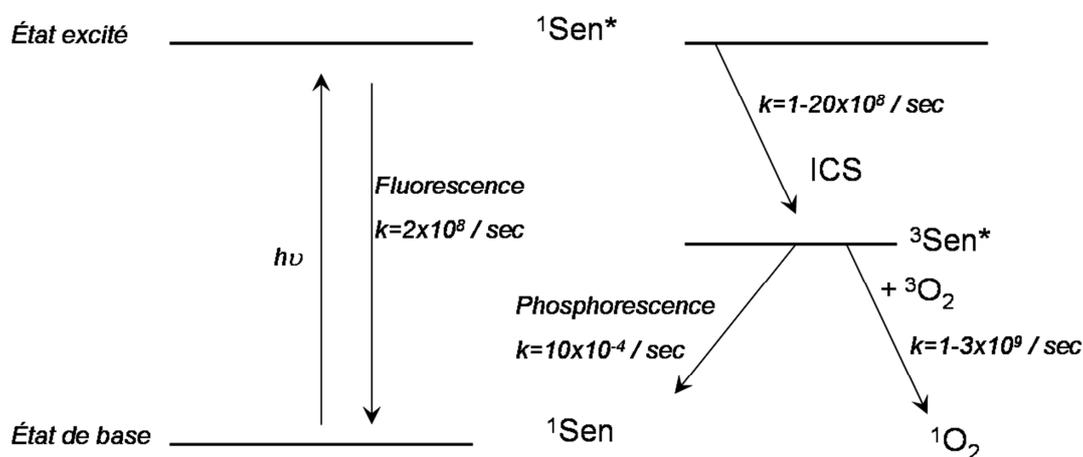


Figure I.2-14: mécanisme chimique de la formation de l’oxygène à singulet en présence de sensibilisateur, de lumière et d’oxygène à triplet<sup>[48]</sup>.

Le croisement inter-système correspond au passage du sensibilisateur excité à singulet, à un état excité à triplet. Le retour de ce dernier à un état énergétique basal peut se faire de différentes façons :

- par phosphorescence (Figure I.2-14)

- par production d’anions superoxydes  $O_2^-$  par transfert d’électrons (Figure I.2-14)
- par acceptation d’un hydrogène ou d’un électron d’un substrat pour produire des radicaux (type I dans la Figure I.2-15).
- par transfert de triplet sur un  $^3O_2$  adjacent pour former directement du  $^1O_2$  par annihilation de triplets (type II dans la Figure I.2-15)

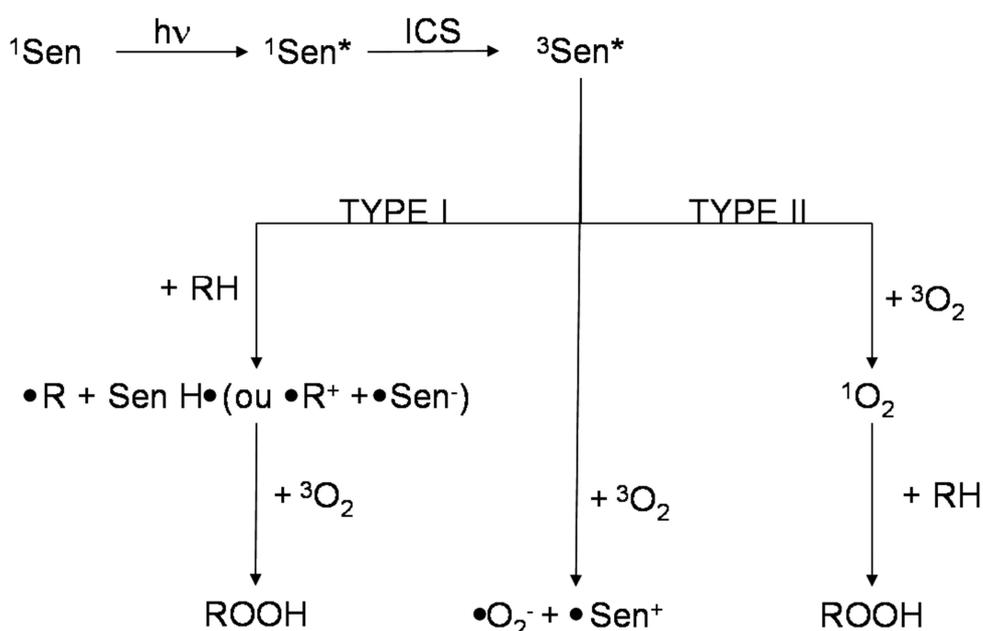


Figure I.2-15: formation du sensibilisateur excité à triplet ( $^3\text{sen}^*$ ) et ses réactions avec les substrats selon des réactions de type I ou de type II<sup>[48]</sup>.

Les anions superoxydes sont à l’origine de la production de peroxyde d’hydrogène  $H_2O_2$ , une des espèces réactives par dismutation spontanée de l’oxygène. La réaction du peroxyde d’hydrogène avec un anion superoxyde est génératrice de l’oxygène singulet  $^1O_2$  par réaction de Haber Weiss en présence de métaux de transition (Fer, Cuivre) (réactions I-9 et I-10).



---

L’ $^1\text{O}_2$ , grandement nucléophile, réagit directement avec les doubles liaisons à haute densité en électrons sans formation de radical alkyle pour former des hydroperoxydes. La réaction d’oxydation à oxygène singulet est très rapide dans les huiles, car une faible énergie d’activation est requise. La vitesse de formation des hydroperoxydes est dépendante du nombre de doubles liaisons portées par les chaînes d’acides gras, mais peu dépendante de leur type (conjugué, non conjugué, diène ou triène). Les hydroperoxydes formés par cette voie se décomposent selon un processus identique à celui de l’auto-oxydation.

#### I.2.4.3 Les Antioxydants.

##### I.2.4.3.1 Antioxydants primaires.

Les anti-oxydants primaires (également appelés antioxydants de type I ou antioxydants de rupture de chaîne) sont des accepteurs de radicaux libres, capables de retarder ou d’inhiber la période d’initiation et/ou d’interrompre l’étape de propagation du phénomène d’auto-oxydation<sup>[34]</sup>.

Les anti-oxydants primaires (AH) réagissent avec les radicaux libres lipidiques et peroxy-lipidiques pour les convertir en produits non radicalaires plus stables (réactions I-11 à I-13). Grâce à une structure résonante, le radical antioxydant produit (A•) possède une énergie plus faible que le radical avec lequel l’antioxydant a réagi (Figure I.2-16).

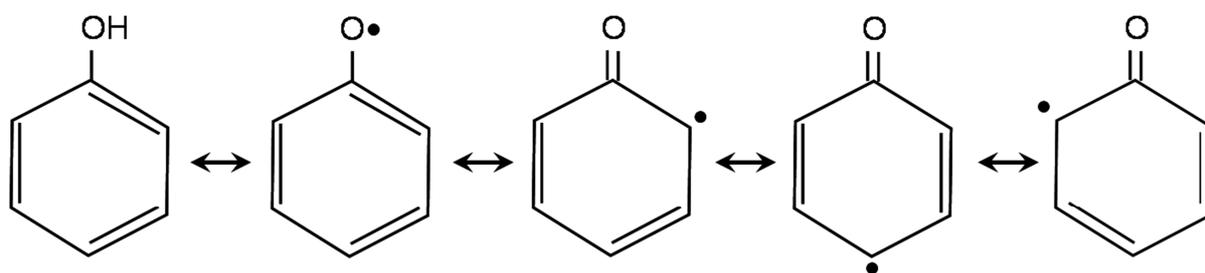
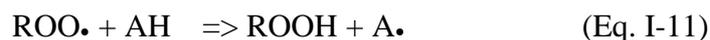


Figure I.2-16 : Stabilisation par résonance d’un radical antioxydant<sup>[34]</sup>.

Enfin, les radicaux antioxydants sont susceptibles de participer à la terminaison des réactions d’auto-oxydation avec les radicaux peroxy-lipidiques, les radicaux oxy-lipidiques ou d’autres radicaux antioxydants (réactions I-14 à I-16).

Les principaux agents donneurs d’hydrogène sont les composés phénoliques mono- ou polyhydroxylés avec des substitutions variées du cycle aromatique. Dans cette catégorie, les antioxydants les plus connus sont les tocophérols et tocotriénols.

Ils sont capables de rentrer en compétition avec les huiles et les graisses vis-à-vis des radicaux peroxy-lipidiques. Une molécule de tocophérol est capable de protéger de  $10^3$  à  $10^8$  molécules d’acides gras polyinsaturés à faible valeur d’indice de peroxyde. Les tocophérols peuvent transférer un atome d’hydrogène de leur noyau chromanol au radical peroxy-lipidique  $\text{ROO}\cdot$ .

pour produire des lipides hydroperoxydés stables et des radicaux tocophéroxy T• (réaction 17), plus stables que les radicaux peroxy-lipidiques par effet de résonance.

A faible taux d’oxydation des lipides, les radicaux tocophéroxy- sont susceptibles de réagir entre eux pour produire des tocophéryl-quinones et régénérer des tocophérols (réaction I-18).

A fort taux d’oxydation des lipides, les radicaux tocophéroxy- (T•) peuvent réagir avec ROO• pour former des complexes tocophérol/peroxy-lipide (T-OOR). Ces derniers peuvent s’hydrolyser en tocophéryl-quinones et hydroperoxy-lipides (réaction I-19).



L’efficacité des tocophérols en tant qu’anti-oxydants dépend :

- des isomères des tocophérols. La capacité de récupération des radicaux libres est plus importante pour le  $\delta$ -tocophérol, suivi par les  $\gamma$ -,  $\beta$ - et enfin les  $\alpha$ -tocophérols.
- De la concentration des tocophérols. La concentration optimale des tocophérols en tant qu’anti-oxydants dépend de leur stabilité oxydative. Plus leur stabilité oxydative est faible, plus leur concentration optimale pour une activité antioxydante maximale est faible. Ainsi, l’ $\alpha$ -tocophérol, le moins stable des isomères, présente une concentration optimale plus faible que les  $\gamma$ - et  $\delta$ -tocophérols. Par exemple, l’ $\alpha$ -, le  $\gamma$ - et le  $\delta$ -tocophérol présentent respectivement des concentrations optimales de 100ppm, de 250ppm et de 500ppm, afin de stabiliser l’huile de soja à 55°C<sup>[49]</sup>.

---

En plus de leur capacité à réduire les radicaux libres, les tocophérols sont capables de diminuer les phénomènes d’oxydation en réprimant l’action du  $^1\text{O}_2$  produit sous l’action de la lumière selon :

- Un procédé physique. Les tocophérols peuvent former un complexe de transfert de charge avec don d’électrons à  $^1\text{O}_2$ . La résultante est la production de  $^3\text{O}_2$  moins réactif. Ce phénomène n’implique pas de réaction chimique entre les tocophérols et  $^1\text{O}_2$ .
- Un processus chimique irréversible impliquant la transformation du tocophérol en tocophérol hydropéroxydiène, tocophéryl quinone et quinone époxyde.

Les composés phénoliques autres que les tocophérols (acides phénoliques, alcools phénoliques, Lignanes etc... voir section 0) exercent également une activité d’anti-oxydant primaire puissant<sup>[34]</sup>.

#### I.2.4.3.2 Antioxydants secondaires.

Les antioxydants secondaires (encore appelés anti-oxydants de types II, ou antioxydants préventifs) agissent selon plusieurs mécanismes. Ils sont capables de ralentir la vitesse d’oxydation mais selon des processus n’impliquant pas la conversion des radicaux libres en des espèces stables. Les processus protecteurs des anti-oxydants secondaires sont multiples<sup>[50]</sup> ; ils peuvent :

- chélater les métaux pro-oxydants ou les désactiver.
- régénérer les hydrogènes labiles des antioxydants primaires et allonger leur durée de vie. On parle d’antioxydants synergistes.
- Décomposer les hydropéroxydes en des espèces non radicalaires.
- Désactiver l’oxygène à singulet.
- Absorber les radiations UV.
- Agir en tant que récupérateur d’oxygène.

---

Les représentants majeurs des antioxydants secondaires naturels sont :

- les phospholipides. De nombreux mécanismes antioxydants ont été démontrés pour les phospholipides. Par exemple, les fonctions amines des Phosphatidyl-Choline, -Sérine et -Ethanolamine présentent la capacité de chélater les métaux. Les phospholipides forment une barrière contre l'O<sub>2</sub> à l'interface Eau/Huile et jouent un rôle de protecteur contre les contacts avec l'oxygène atmosphérique. Les phospholipides favorisent la dispersion des autres antioxydants actifs et limitent la propagation des radicaux libres. Judde et coll., 2003<sup>[51]</sup>, ont démontré une action synergique importante des phospholipides amino-alcooliques avec les tocophérols de la série  $\gamma$  et  $\delta$  mais moins prononcée avec les  $\alpha$ -tocophérols. Ils ont attribué ces propriétés à la capacité des fonctions amines des phospholipides à régénérer les tocophérols.
- les caroténoïdes, et plus spécifiquement le  $\beta$ -carotène, de par leur structure contenant de nombreuses doubles liaisons conjuguées, sont capables de limiter l'oxydation des huiles. Plusieurs processus sont décrits : filtration de l'énergie lumineuse surtout entre 400 et 500 nm, répression de l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> par transfert d'énergie aux caroténoïdes sans générer de produits oxydés, inactivation des sensibilisateurs et récupération des radicaux libres<sup>[34]</sup>.
- Les stérols. L'action des stérols en tant qu'antioxydants est encore floue. Un certain nombre de stérols issus de plantes, spécialement les  $\Delta$ 5- et  $\Delta$ 7-avénasterols, le citrostanérol et le vernostanérol, ont été décrits comme inhibiteurs de la dégradation oxydative des acides gras insaturés à haute température<sup>[52, 53]</sup>. Au contraire, certains stérols tels que le sitostérol, stigmastérol et le campestérol sont soit inactifs soit pro-

oxydants<sup>[54]</sup>. Les stérols tiennent leur pouvoir antioxydant de la présence d’un groupement éthylidène dans leur chaîne latérale. Les radicaux lipidiques sont susceptibles de réagir avec ce dernier groupement, qui va pouvoir s’isomériser en un radical tertiaire plus stable, bloquant ainsi la réaction d’oxydation<sup>[52]</sup>.

### **I.3 Les esters d’acides gras.**

#### **I.3.1 Les Marchés cibles.**

Historiquement, la transformation des huiles a été développée pour un usage de substitution aux carburants pétroliers. L’utilisation directe des huiles dans les moteurs a été testée dès les premiers essais de moteurs diesel. Malheureusement, elle s’accompagne d’un certain nombre d’inconvénients. En effet, la structure même des triglycérides leur confère des viscosités pouvant être élevées et des propriétés d’ignition faibles (Table I.3-1).

La transestérification des triglycérides avec des alcools pour former des esters permet d’ajuster les propriétés des produits de transformation vers les caractéristiques des pétrodiesels<sup>[55]</sup>.

**Table I.3-1 : Quelques propriétés physico-chimiques d’huiles végétales et des esters méthyliques issus de ces mêmes huiles** <sup>[55]</sup>. EM : Esters méthyliques issus de l’huile végétale considérée.

Huile Végétale / EM	Viscosité cinématique mm <sup>2</sup> /s à 40°C	Densité g/cm <sup>3</sup> à 21°C	Nombre de Cétane	Point d’éclair °C
Soja / EM	33,1 / 4,08	0,914 / 0,884	38,1 / 50,9	254 / 131
Colza / EM	37,3 / 4,83	0,912 / 0,882	37,5 / 52,9	246 / 155
Tournesol / EM	34,4 / 4,6	0,916 / 0,880	36,7 / 49	274 / 183
Suif / EM	51,2 / 5	0,920 / 0,877	40,2 / 58,8	201 / 150
Diesel	2,0 à 4,5	0,820 à 0,860	51	55

Les esters d’acides gras ont par ailleurs de nombreuses propriétés intéressantes qui permettent de les utiliser dans plusieurs autres domaines d’application tels que celui des biolubrifiants<sup>[56-58]</sup> ou encore celui des biosolvants<sup>[59, 60]</sup>.

### I.3.1.1 Les biodiesels.

Les biocarburants, liquides ou gazeux, sont considérés aujourd’hui comme une réelle alternative aux carburants pétroliers. Deux types de biocarburants sont actuellement produits et utilisés : l’éthanol dans les moteurs de type essence et les biodiesels (esters méthyliques d’huiles végétales) dans les moteurs de type diesel. A l’échelle mondiale, c’est l’usage de l’éthanol qui est largement majoritaire, la consommation de biodiesel étant environ 10 fois inférieure (Figure I.3-1).

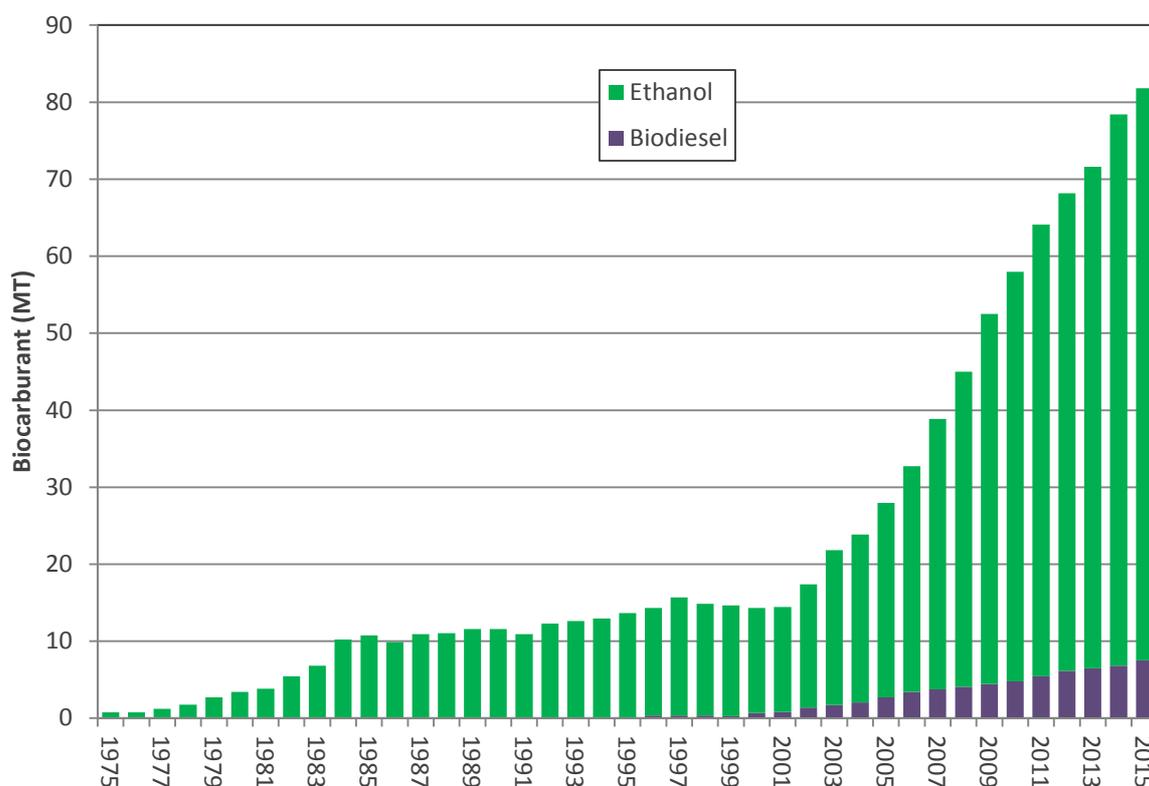
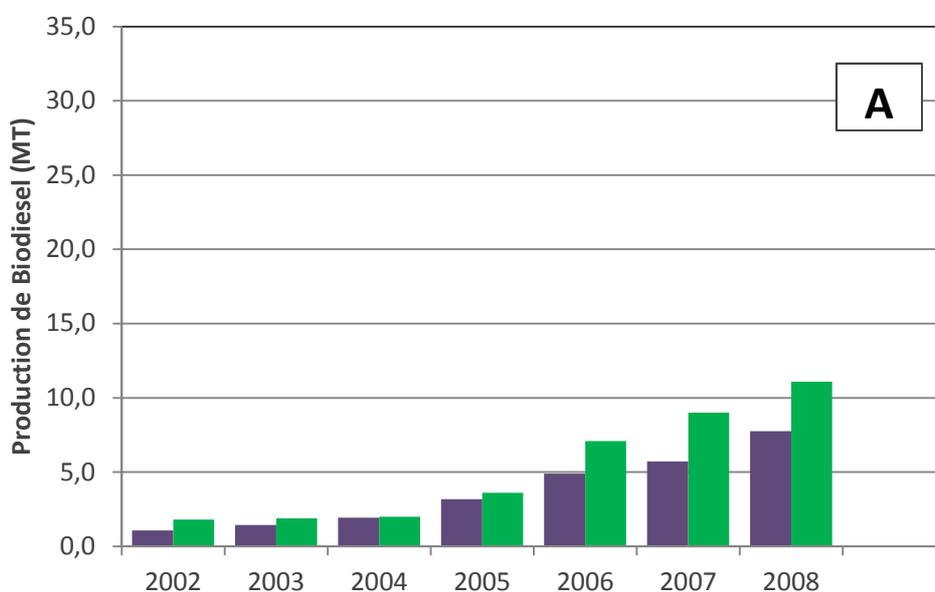


Figure I.3-1: Evolution de la production de biocarburants dans le monde (en millions de tonnes).<sup>[61]</sup>

Le marché mondial du biodiesel est dominé par l’Europe dans laquelle existe une domination croissante de la consommation de gazole (60% de la consommation de carburants). La production européenne atteignait en 2008, 7,7 millions de tonnes (Figure I.3-2: Production (A) et Capacités de production (B) européennes (violet) et mondiales (vert) de biodiesel depuis 2002<sup>[62]</sup>.

-A) assurant ainsi 70% de la production mondiale. Plus précisément, 2,8 millions de tonnes ont été produites en Allemagne et 1,8 million en France<sup>[62]</sup>. Cependant, les capacités de production sont encore peu exploitées puisqu’elles sont estimées à plus de 32,6 millions de tonnes à un niveau mondial et à 20,9 millions de tonnes au niveau européen (Figure I.3-2: Production (A) et Capacités de production (B) européennes (violet) et mondiales (vert) de biodiesel depuis 2002<sup>[62]</sup>.

-B). Le marché est néanmoins en constante progression puisqu’il a augmenté de près de 35% entre 2007 et 2008, 13,8% entre 2006 et 2007<sup>[62]</sup>.



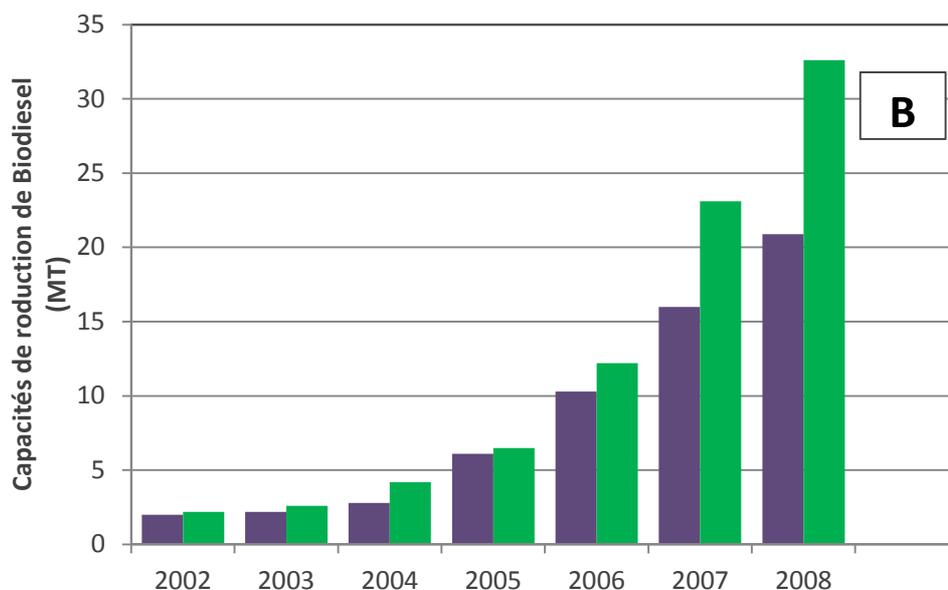


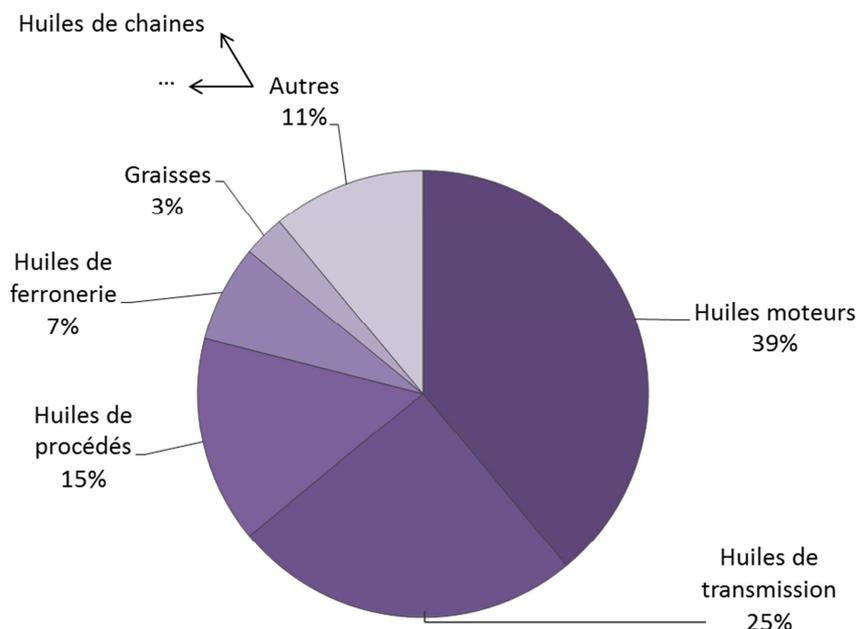
Figure I.3-2: Production (A) et Capacités de production (B) européennes (violet) et mondiales (vert) de biodiesel depuis 2002<sup>[62]</sup>.

### I.3.1.2 Les biolubrifiants.

Un lubrifiant représente un mélange de produits pouvant être complexe, constitué de 70% à 90% d’huiles ou dérivés, enrichi ou non d’additifs pour en modifier les propriétés. Les lubrifiants assurent des fonctions variées telles que diminuer les frictions et l’usure, assurer des transferts de chaleur, assurer une protection vis-à-vis de la corrosion, assurer les transferts de forces etc ...<sup>[63]</sup>. On parle de biolubrifiant lorsque tout ou partie du produit est d’origine végétale. En Europe, le terme biolubrifiant désigne parfois l’ensemble des lubrifiants issus du pétrole ou de la biomasse, qui sont dégradables.

Le marché européen des lubrifiants représentait en 2005, 4,6 millions de tonnes. Le marché se segmente en plusieurs domaines d’application (Figure I.3-3). Les huiles moteur représentent la plus grande part de marché avec un volume de 1,8 million de tonnes (39% de parts de marché). Les huiles de transmission (fluides hydrauliques) constituent le second marché avec

25% des parts de marché (1,2 millions de tonnes). Le reste du marché est partagé entre les huiles utilisées en ferronnerie (0,7 million de tonnes) selon une étude Alcimed pour Syngenta Seeds (High oleic in Europe, 2007) <sup>[64]</sup>.



**Figure I.3-3: Segmentation du marché européen des lubrifiants<sup>[64]</sup>.**

La part des produits biodégradables dans le marché européen des lubrifiants est de seulement 2% avec un volume de 100 000 tonnes. L'Allemagne fait figure de market leader avec une production totale de lubrifiants biodégradables de 50 000 tonnes, soit 50 % de la production européenne, suivie par la Scandinavie et l'Autriche. Le marché des biolubrifiants s'adresse plus spécifiquement à des applications telles que les fluides hydrauliques (51% du marché des biolubrifiants), les huiles de chaînes de scies (29% du marché) ou les agents de décoffrage (11% du marché) (Figure I.3-4).

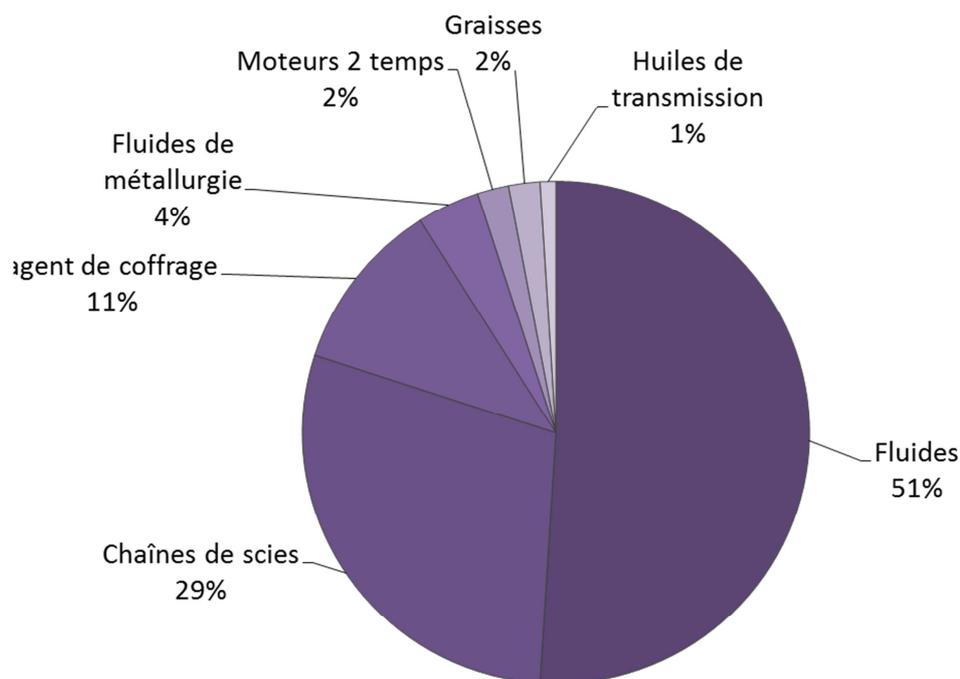


Figure I.3-4: Segmentation du marché européen des biolubrifiants<sup>[64]</sup>.

La consommation française de lubrifiants a été en 2005 d'environ 770 000 tonnes. Les lubrifiants pétrochimiques biodégradables représentaient moins de 3 500 tonnes et les lubrifiants d'origine végétale, moins de 1 000 tonnes (soit environ 0,1% du marché européen). Un prix des biolubrifiants en Europe, de 2 à 5 fois plus élevé que celui des lubrifiants pétrochimiques, explique en partie cette faible part de marché en France et en Europe

Il est reconnu que 50% des lubrifiants vendus dans le monde terminent leur vie dans l'environnement. Les causes les plus souvent identifiées sont des applications à perte (application dans des engrenages en extérieur...), une volatilité importante des substances ou encore des accidents (renversement etc..) <sup>[65]</sup>. En 2006, plus de 95% de ces matières étaient de sources minérales. Au vu de leur haute écotoxicité et de leur faible biodégradabilité, les lubrifiants minéraux représentent une réelle menace pour l'environnement. Il apparaît donc urgent de remplacer les produits non dégradables par des bioproduits. Ainsi, les biolubrifiants

---

bénéficient d’une dynamique politique et réglementaire favorable (REACH, Eco-Label....). Les prévisions estiment un taux de croissance du marché de l’ordre de 5 à 10% par an<sup>[65]</sup>. Dans le groupe de travail préparatoire au rapport "Plan stratégique Chimie du végétal et biomatériaux" publié en janvier 2007, les experts ont estimé que le marché français des biolubrifiants pourrait s’établir autour de 20 000 tonnes en 2015 et, que sous l’action d’une politique volontariste, il atteindrait même 200 000 tonnes.

### I.3.1.3 Les biosolvants.

Les solvants sont considérés comme des substances capables de dissoudre, de diluer ou d’extraire d’autres substances sans engendrer de modification chimique. Les biosolvants sont totalement ou partiellement de provenance végétale. En fonction de leurs propriétés, les solvants trouvent leurs applications en tant que diluants ou adjuvants dans le domaine des revêtements (peintures, vernis, encres), des produits phytosanitaires (pesticides), des adhésifs etc... Le marché européen en 2 000 équivalait à 4,1 millions de tonnes. La segmentation du marché est présentée dans la Figure I.3-5. Le secteur des peintures et revêtements représente le marché le plus volumineux avec 41% des parts. Suivent les secteurs de solvants de synthèse dans les industries chimiques et pharmaceutiques (14,6% du marché des solvants) ou le secteur de l’imprimerie (8,4% du marché).

En Europe, la consommation de solvants neufs est en baisse régulière : elle enregistre une diminution estimée d’environ 15 % entre 1994 et 2007<sup>[66]</sup>. Cette tendance s’explique d’une part par un recours important au recyclage des solvants et d’autre part, par une utilisation plus modérée des solvants chlorés et hydrocarbonés, en raison des pressions réglementaires.

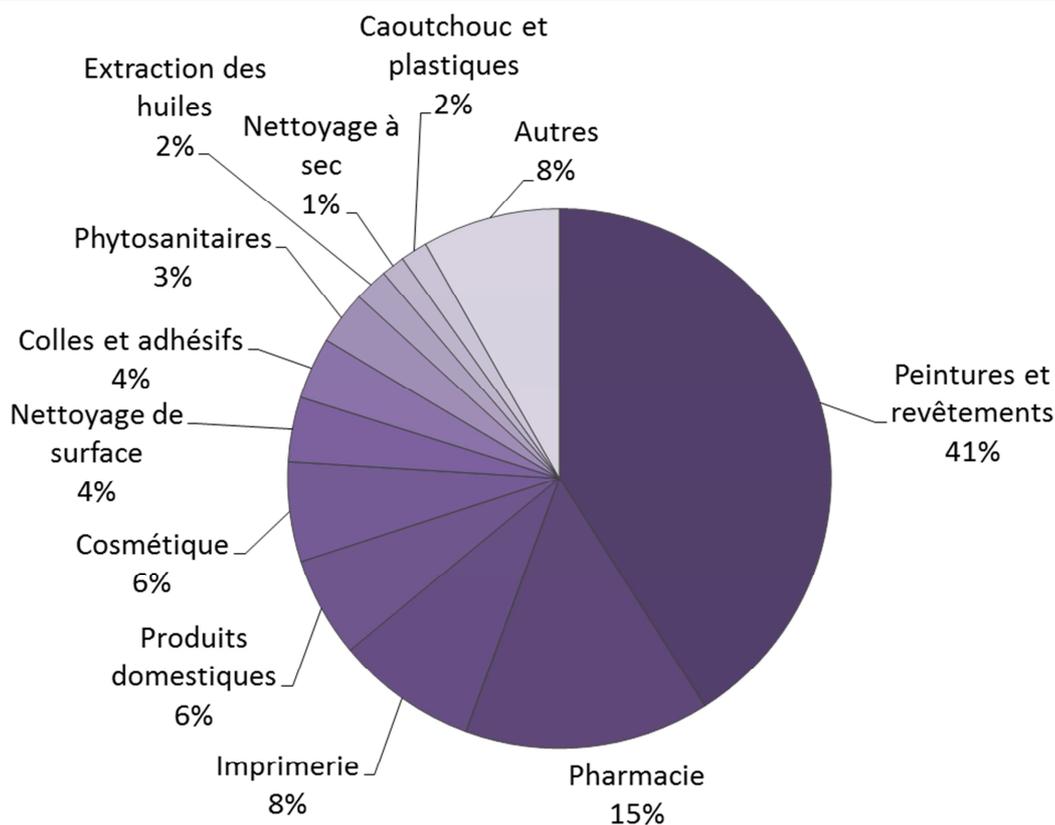


Figure I.3-5 : Répartition des marchés des solvants en 2000 en Europe selon les secteurs d’application<sup>[67]</sup>.

Le marché des solvants reste encore dominé par les solvants d’origine pétrochimique. Le taux de pénétration des bioproduits en France est faible, de l’ordre de 1,3%. Ces biosolvants appartiennent essentiellement à trois familles : les esters d’acides fermentaires, l’éthanol et terpènes (alcools terpéniques) et les esters d’acides gras.

Les prévisions de marché sont néanmoins positives pour les biosolvants, car le marché profite des pressions réglementaires de substitution des produits chimiques (REACH, directives européennes contre les composés organiques volatils ...).

### **I.3.2 Propriétés essentielles des esters d’acides gras.**

Les esters d’acides gras utilisés en tant que biodiesel, biolubrifiant ou biosolvant sont caractérisés par un certain nombre de paramètres, représentant leurs propriétés physicochimiques.

---

### I.3.2.1 Le nombre de cétanes (propre aux biodiesels).

Le nombre de cétanes (NC) est l’indicateur premier de la qualité de combustion des biodiesels et correspond au contraire de l’indice d’octane du gasoil. Il est inversement proportionnel au temps d’ignition du biodiesel, c'est-à-dire au délai requis entre l’injection et le début de la combustion<sup>[55, 68]</sup>. Un nombre de cétanes trop faible est responsable du “coup de diesel” (accumulation de biodiesel dans la chambre de combustion d’un moteur provoquant une forte surpression, responsable d’émission de bruits et de fumées). Un nombre de cétanes trop élevé induit en revanche la surchauffe des injecteurs.

L’échelle de cétane se base sur un hydrocarbure à longue chaîne auquel est attribué un NC de 100 (l’hexadécane) et sur un composé hautement ramifié en tant que référence basse avec un NC de 15 (le 2,2,4,4,6,8,8-heptaméthylnonane)<sup>[69]</sup>. Les standards admis pour les biodiesels prescrivent des NC minimums de 47 (USA) à 51 (Europe).

### I.3.2.2 Le point d’éclair.

Le point d’éclair des esters d’acides gras représente la température la plus basse à laquelle ils sont susceptibles de s’enflammer au contact d’une flamme. Cette température est particulièrement importante dans un contexte sécuritaire de stockage ou de transport des esters, quelles que soient leurs utilisations. Le point d’éclair proprement dit est corrélé à la volatilité des liquides. Comme le montre la Table I.3-1, les points d’éclair des esters d’alkyle issus d’huiles végétales peuvent être bien supérieurs à ceux des produits issus de la pétrochimie (trois fois plus élevés que le gazole par exemple) ce qui reflète une volatilité très faible de ces esters. Cela permet d’ailleurs de souligner un avantage certain des esters d’alkyl : un risque d’incendie relativement faible<sup>[69]</sup>.

Le point d’éclair ne doit pas être confondu avec le point d’auto-ignition, qui reflète la température à laquelle des esters d’acides gras s’enflamment spontanément sans présence de source d’ignition extérieure.

### I.3.2.3 Les propriétés d’écoulement à basse température

Les propriétés d’écoulement à basse température sont des éléments essentiels des esters d’acides gras en vue de leur utilisation en tant que biodiesel, biolubrifiant ou biosolvant. Elles sont essentiellement caractérisées par trois températures<sup>[69]</sup>:

- Le point de trouble : température la plus basse à partir de laquelle les cires cristallisent dans les esters et entraînent un trouble du produit.
- Le point d’écoulement : température la plus basse à laquelle le mélange d’esters est capable de s’écouler et d’être pompé. Ce sont les paraffines et cires qui sont responsables du figeage des esters.
- Le point de fusion : température à laquelle les esters d’acides gras passent de l’état solide à l’état liquide. Ce point de fusion est dépendant de la nature des acides gras et des résidus alkyls (voir section I.3.3).

De façon générale, les esters d’acides gras issus des huiles végétales, possèdent des points de trouble et d’écoulement plus élevés que les produits issus de l’industrie pétrolière (Table I.3-1 page 90).

### I.3.2.4 Viscosité et index de viscosité.

La viscosité représente également l’un des paramètres les plus importants des esters d’acides gras. Elle est en effet l’une des causes majeures de la nécessité de transformer les triglycérides des huiles en esters. La viscosité des esters est en effet d’un ordre de grandeur plus faible que celle des triglycérides correspondants (voir Table I.3-1, page 90).

De plus, la viscosité influence de nombreux paramètres dans leurs applications. Par exemple, lors de leur utilisation en tant que biodiesel, la viscosité va influencer la formation du spray de carburant, du mélange air/carburant, et le processus de combustion. Dans le cas des biolubrifiants, elle va influencer la capacité de l’huile à former un film lubrifiant, à minimiser les frottements et donc à réduire l’usure.

Techniquement, la viscosité d’un ester mesure sa résistance aux contraintes de cisaillement. Mais la viscosité est plus communément associée à la résistance à l’écoulement d’un ester ou mélange d’esters. Si un ester est considéré comme une série de plans superposés les uns sur les autres, la viscosité de l’huile mesure la résistance à l’écoulement entre les plans individuels. Une haute viscosité implique une résistance à l’écoulement importante et inversement pour une faible viscosité. Cette mesure est appelée viscosité dynamique. Dans l’industrie des esters d’acides gras, la viscosité cinématique, correspondant au quotient de la viscosité dynamique par la masse volumique du fluide, est également très utilisée. Les gammes de viscosité acceptables pour les biodiesels sont normalisées (Table I.3-2).

**Table I.3-2: Viscosité cinématique dans les normes diesels.**

Normes	Lieu	Source	Méthode	Viscosité cinématique (m <sup>2</sup> /s)
ASTM D975	USA	Pétrodiesels	ASTM D445	1,9 - 4,1
ASTM D6751	USA	Biodiesels	ASTM D445	1,9 - 6,0
EN 590	EU	Pétrodiesels	ISO 3104	2,0 - 4,5
EN 14214	EU	Biodiesels	ISO 3104	3,5 - 5,0

L’index de viscosité (IV) est également une grandeur souvent employée, essentiellement dans l’industrie des lubrifiants. Cette valeur permet de rendre compte de l’effet de la température sur la viscosité d’un lubrifiant. Une haute valeur de IV indique de faibles variations de viscosité avec la température, et inversement.

#### I.3.2.5 Résistance à l’oxydation.

Les produits issus de la transformation des huiles végétales sont hautement exposés aux processus oxydatifs notamment lors du stockage des produits et lors de leur utilisation (voir

---

section I.2.4). L’oxydation des esters est susceptible d’affecter la qualité des produits par l’apparition de produits contaminants (péroxydes, polymères, acides gras libres). Une spécification de stabilité oxydative a été incluse dans les normes européennes concernant les biodiesels : EN 14213<sup>[70]</sup> et EN 14214<sup>[71]</sup>. Ces normes imposent une mesure accélérée de la résistance à l’oxydation à 110°C sous 10 L.min<sup>-1</sup> d’O<sub>2</sub> par la méthode Rancimat. Un temps d’induction minimum de 6h est requis pour les biodiesels (EN14213<sup>[70]</sup>) et de 4h pour les biodiesels de chauffage (EN14214<sup>[71]</sup>). La méthode OSI (Oxydative Stability Index)<sup>[72]</sup> est la méthode recommandée par l’AOCS pour la mesure de la stabilité oxydative. Les deux méthodes, Rancimat et OSI, sont quasiment identiques.

De nombreux autres paramètres sont également mesurés pour identifier les phénomènes d’oxydation : Indice d’acide, Indice de peroxyde etc ...<sup>[73]</sup>.

Bien souvent, les temps d’induction des esters issus d’huiles végétales ne sont pas suffisants pour répondre aux normes. Dans ce cas, l’utilisation d’anti-oxydants est nécessaire. Ils peuvent être d’origine naturelle (Tocophérols, cf. section I.2.4.3) ou d’origine synthétique (hydroxytoluène butylé, pyrogallol, *tert*-butyl hydroquinone par exemple). L’influence des antioxydants sur les temps d’induction au rancimat est illustrée dans la Table I.3-3 suivante.

Par exemple, il est nécessaire d’ajouter des antioxydants naturels (tocophérols) ou artificiels (BHT, TBHQ) aux esters méthyliques issus de l’huile de palme afin qu’ils soient conforme à la norme de stabilité oxydative EN14213. Les esters méthyliques d’huile de colza distillée présentent une stabilité oxydative inférieure à ceux issus d’huile non distillée. Les capacités de résistance à l’oxydation sont une fois de plus largement améliorées en présence d’antioxydant (PY)

**Table I.3-3 : Valeurs de résistance oxydative mesurée par la technique de Rancimat à 110°C, avec 10L.min<sup>-1</sup> d’oxygène<sup>[73]</sup>. BHT : hydroxytoluène butylé, PY : pyrogallol, TBHQ : *tert*-butyl hydroquinone**

<b>Matière testée</b>	<b>Additif</b>	<b>Rancimat (h)</b>
Esters méthyliques de Palme	Vitamine E 664ppm	25,7
Esters méthyliques de Palme	Aucun	3,52
Esters méthyliques de Palme distillés	$\alpha$ -tocophérol 1000ppm	6,17
Esters méthyliques de Palme distillés	BHT 50ppm	6,42
Esters méthyliques de Palme distillés	TBHQ ppm	8,85
Esters méthyliques de Colza distillés	Aucun	4,78
Esters méthyliques de Colza distillés	BHT	8,65
Esters méthyliques de Colza distillés	PY	25,3
Esters méthyliques de Colza non distillés	Aucun	6,94
Esters méthyliques de Colza non distillés	BHT	9,58
Esters méthyliques de Colza non distillés	PY	24,1

### **I.3.3 Influence de la composition des esters sur les propriétés physico-chimiques des esters d’alkyle.**

De nombreux facteurs structurels peuvent influencer les propriétés des esters d’acides gras<sup>[74]</sup>.

Peuvent être cités :

- La longueur de chaîne des constituants des esters.
- Le nombre et configuration de doubles ou triples liaisons
- Les ramifications
- La stéréochimie
- La présence d’un ou plusieurs groupements polaires (hydroxyles par exemple).

L’alcool le plus utilisé pour la production d’esters à partir d’huiles végétales est le méthanol du fait de son coût relativement bas. Cependant, à la fois la chaîne d’acide gras et la fonction alcool des esters contribuent à leurs propriétés globales. Il est donc intéressant de considérer les propriétés liées à des alcools différents du méthanol.

### I.3.3.1 Effet sur le nombre de cétanes.

Le nombre de cétanes dépend grandement des propriétés physico-chimiques des acides gras entrant dans la composition du mélange d’esters. De fait, les esters issus d’huiles différentes présentent des NC différents : les esters d’huile de soja et de tournesol présentent souvent des NC plus faibles que les esters d’huiles saturées. Plusieurs auteurs proposent des corrélations entre NC et les propriétés mesurables des acides gras. Par exemple, Klopfenstein, 1985<sup>[75]</sup>, établit une relation entre estimation du NC et nombre de carbone de l’acide gras de l’ester méthylique. Freedman and Bagby, 1990<sup>[76]</sup>, observent que le nombre de cétanes peut être relié à plusieurs paramètres physico-chimiques tels que le nombre de carbones composant l’ester, son point d’ébullition, sa densité ou encore son index de réfraction.

Lapuerta et coll, 2009<sup>[77]</sup>, recense l’ensemble des NC donnés dans la littérature pour les esters purs de taille croissante. Les données sont illustrées dans la Figure I.3-6 suivante.

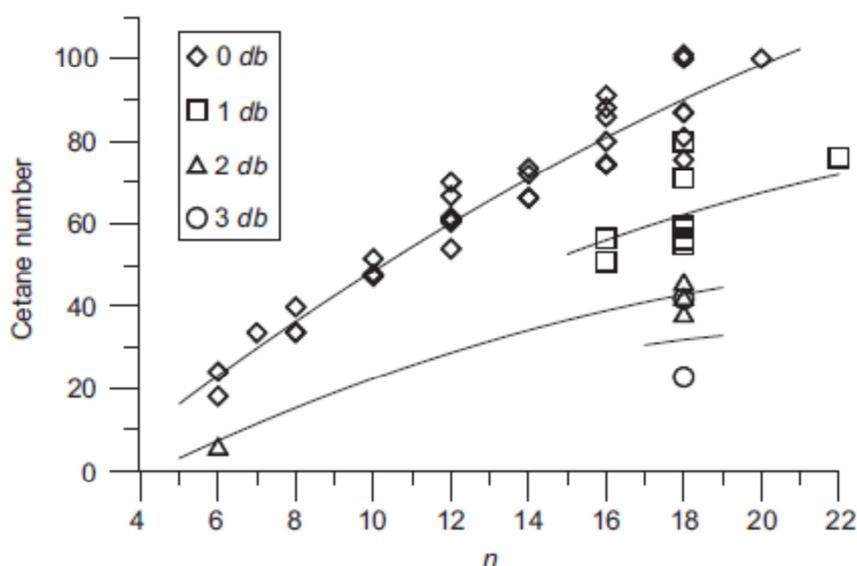


Figure I.3-6 : Corrélation entre nombre de cétane et nombre de carbone d’esters méthyliques. Influence des doubles liaisons<sup>[77]</sup>. n : nombre de carbones ; db : double liaison.

---

D’une manière générale, le nombre de cétones augmente avec le nombre de carbones. L’introduction de doubles liaisons dans la chaîne carbonée des esters diminue la valeur de NC. En d’autres termes, plus la séquence d’éléments  $-CH_2$  dans la chaîne carbonée de l’ester est grande, plus le NC est important.

Knothe et coll, 2003<sup>[68]</sup>, établissent la mesure de NC d’esters obtenus à partir de différents alcools, linéaires et branchés. Le NC augmente avec le nombre de carbones des alcools constitutifs dans l’ordre méthyle < éthyle < propyle < butyle (mais des exceptions existent souvent). L’introduction de branchement dans la fonction alcool de l’ester ne semble pas réduire significativement le NC.

### I.3.3.2 Effet sur le point de fusion.

Récemment, Knothe et Dunn, 2009<sup>[74]</sup>, recensent les points de fusion (PF), mesurés par calorimétrie différentielle à balayage, de nombreux acides gras et esters (méthyliques, éthyliques, propyliques et butyliques) saturés, linéaires ou ramifiés, mono- et poly-insaturés. Ils confirment ainsi les observations de la littérature antérieure<sup>[78]</sup> : les PF des esters d’acides gras linéaires saturés sont directement reliés au nombre de carbones composant leur chaîne. Par exemple, la température de fusion augmente d’environ  $-44^{\circ}C$  à environ  $-13^{\circ}C$  (soit  $+31^{\circ}C$ ) lorsque le nombre de carbones d’esters méthyliques augmente uniquement de 2 unités (de C8 à C10) (Figure I.3-7). On note un effet de créneau dans l’augmentation des températures de fusion, l’augmentation de température des esters d’acides gras impairs étant plus faible que celle des esters d’acides gras pairs.

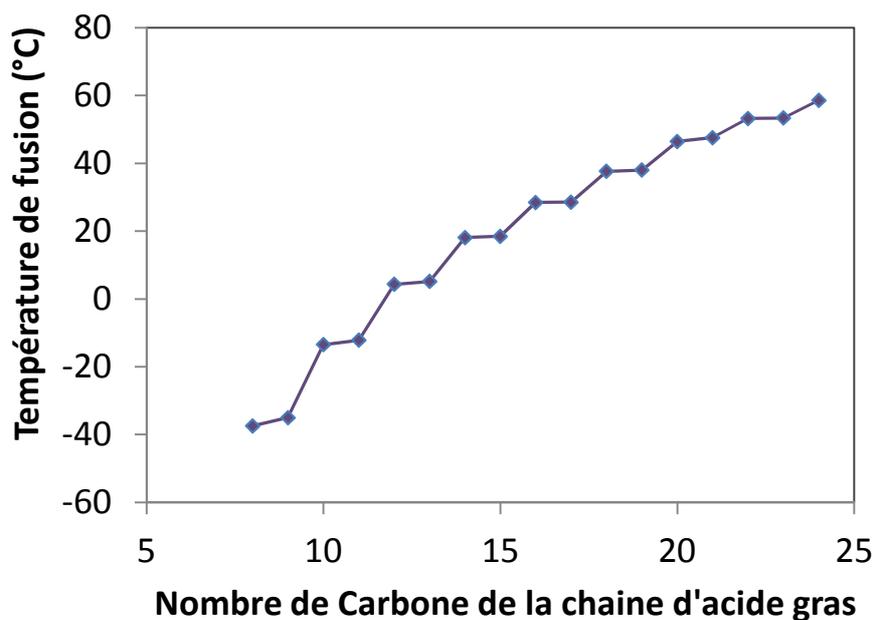


Figure I.3-7: Points de fusion (°C) d'esters méthyliques d'acides gras saturés linéaires<sup>[74]</sup>.

L'introduction d'une double liaison *cis* dans la chaîne carbonée s'accompagne d'une diminution nettement marquée de la température de fusion des esters correspondants (Figure I.3-8). Ce phénomène s'accroît avec la présence de plusieurs doubles liaisons dans la chaîne carbonée. En effet, les PF des esters éthyliques d'acide stéarique (C18:0), de l'acide oléique (C18:1<sup>Δ9</sup>), de l'acide linoléique (C18:2<sup>Δ9,12</sup>) et linoléique (C18:3<sup>Δ9,12,15</sup>) sont respectivement de 32,98°C, de -20,32°C, de -56,72°C et de -61,71°C.

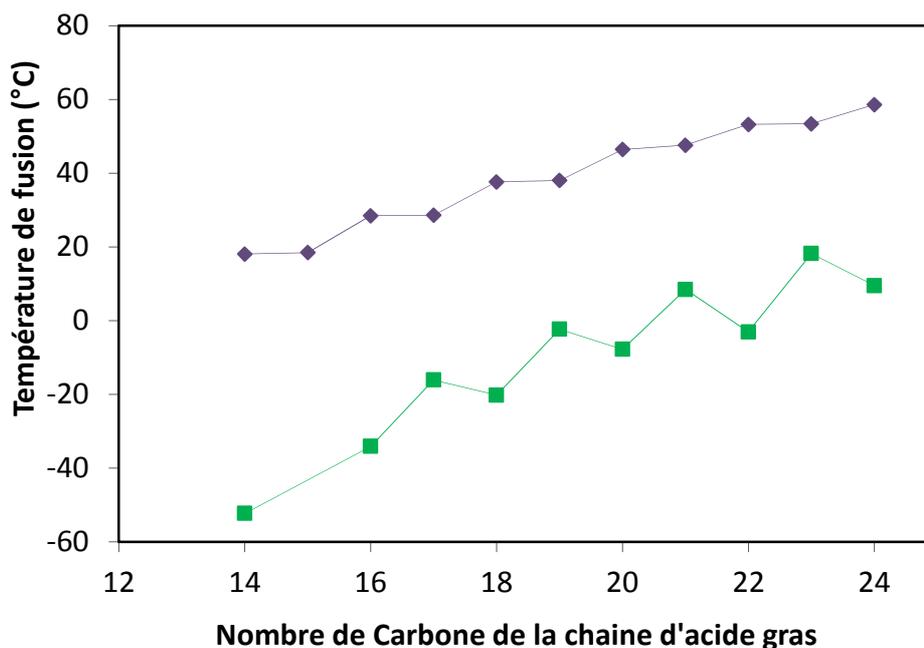


Figure I.3-8: Températures de fusion (°C) d’esters méthyliques (□) *cis* mono-insaturés  $\omega$ -9 de longueur de chaîne carbonée croissante, comparées aux esters méthyliques saturés équivalents (◇)<sup>[74]</sup>.

La configuration *cis* des doubles liaisons est importante dans cette réduction des points de fusion des esters. En effet, cette configuration entraîne une cassure dans la chaîne carbonée qui diminue les interactions entre chaînes. Au contraire, une configuration *trans* conserve une structure proche de son correspondant saturé et la diminution de température de fusion est moindre.

Knothe et Dunn, 2009<sup>[74]</sup>, rapportent également un effet important de diminution des températures de fusion lorsque la chaîne carbonée des esters considérés est ramifiée. Par exemple, la différence de PF de l’ester méthylique d’acide stéarique et de son équivalent ramifié (l’ester méthylique d’acide iso-stéarique : 16-méthyl-C17) est de quasiment 10°C (37,66°C et 27,98°C respectivement).

Yao et coll., 2008<sup>[79]</sup> ont mesuré les points de fusion d’esters d’acide oléique avec des alcools aliphatiques de 1 à 12 carbones. Les PF ainsi obtenus sont donnés dans la Figure I.3-9 et

montrent une diminution pour des alcools de 1C à 4C. Au delà, les PF augmentent de nouveau avec le nombre de carbones de l’alcool d’estérification.

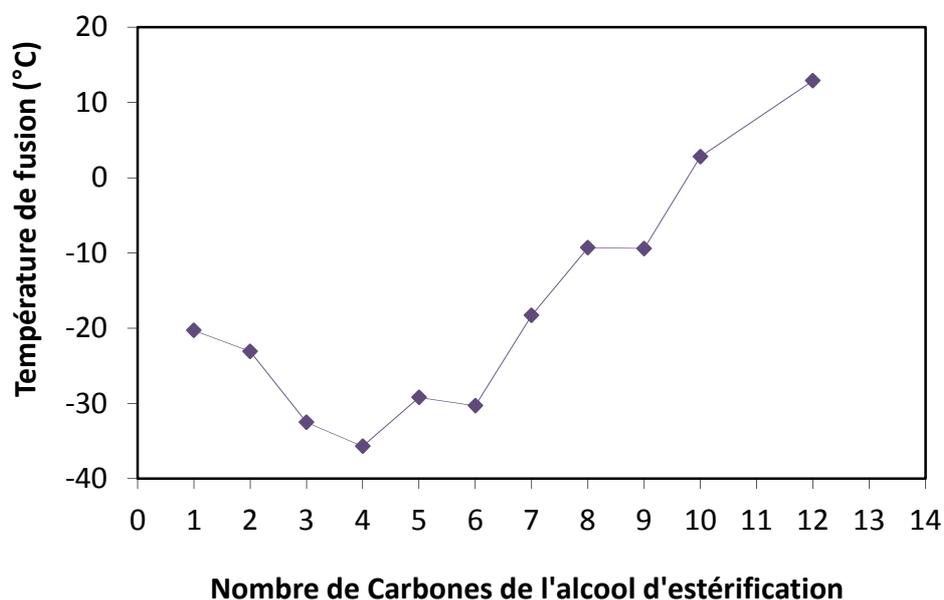


Figure I.3-9: Températures de fusion (°C) d’esters de l’acide oléique avec des alcools aliphatiques linéaires de 1 carbone à 12 carbones<sup>[79]</sup>.

Lee et coll., 1995<sup>[80]</sup>, démontrent que l’introduction de ramification dans les résidus alcooliques constituant les esters, en utilisant du 2-propanol ou du 2-butanol en lieu et place de leurs homologues 1-hydroxylés, permettait de diminuer les PF d’esters synthétisés à partir d’huiles de différentes sources. Yao et coll, 2008<sup>[79]</sup>, démontrent le même phénomène avec l’ester isopropylique et 2-butylique de l’acide oléique. Les esters ont présenté une température de cristallisation réduite respectivement de 5°C et de 4,5°C par rapport aux esters non ramifiés (Figure I.3-10).

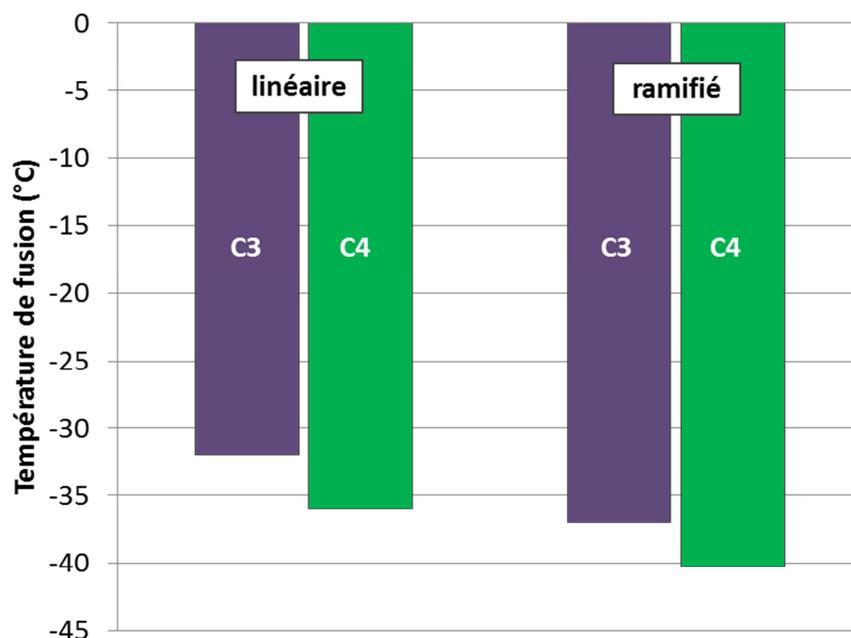


Figure I.3-10 : Températures de fusion (°C) d’esters linéaires et ramifiés d’huile de soja<sup>[79]</sup>. C3 linéaire : esters de propyle ; C4 linéaire : esters de butyle ; C3 ramifié : esters de 2-propyle ; C4 ramifié : esters de 2-butyle.

### I.3.3.3 Effet sur la viscosité.

Allen et coll, 1999<sup>[81]</sup>, ont testé la viscosité à 40°C d’esters méthyliques et éthyliques purs. Leurs résultats sont fournis dans la Figure I.3-11. Ces travaux montrent nettement la corrélation entre viscosité et longueur de la chaîne carbonée des esters. En effet, à 40°C, la viscosité des esters méthyliques passe de environ 1 mPa.s pour un C8 saturé à environ 5 mPa.s pour un C18 saturé. Par ailleurs, l’introduction de doubles liaisons dans la chaîne carbonée entraîne une diminution notable de la viscosité, dépendante du nombre d’insaturation. Ainsi, Allen et coll, 1999<sup>[81]</sup>, observent une réduction de viscosité de 21% entre le C18 :0 et le C18 :1, de 18% entre le C18 :1 et le C18 :2 et de 13% entre C18 :2 et C18 :3 (soit 56% au total entre C18 :0 et C18 :3).

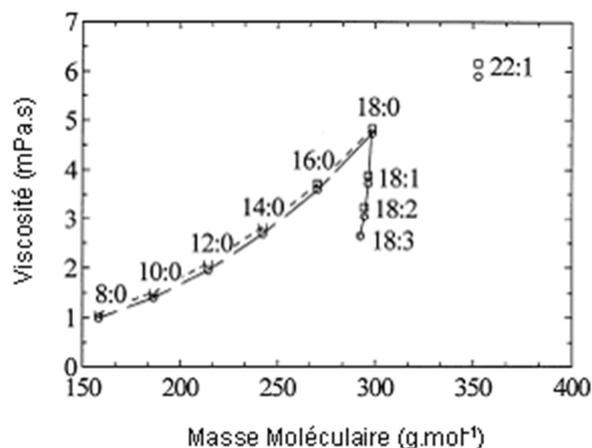


Figure I.3-11 : Viscosité d’esters méthyliques (□) et éthyliques (○) purs à 40°C<sup>[81]</sup>.

Knothe et Steidley, 2005<sup>[82]</sup> démontrent l’importance de la nature et de la position de la double liaison dans la chaîne carbonée sur l’effet de diminution de la viscosité cinématique : les doubles liaisons situées en bout de chaîne carbonée entraînent une diminution de viscosité plus discrète. De même, les viscosités obtenues avec les doubles liaisons de configuration *trans* sont plus importantes que pour leurs homologues *cis*. Par ailleurs, Knothe et Steidley, 2005<sup>[82]</sup>, constatent une viscosité bien plus élevée lorsque des fonctions hydroxyles sont présentes dans la chaîne (viscosité cinématique de l’ester méthylique d’acide oléique : 4,51 mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>; viscosité cinématique de l’ester méthylique d’acide ricinoléique : 15,44mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>).

Yao et coll, 2008<sup>[79]</sup>, se sont intéressés à l’effet de la partie alcool des esters d’acides gras en mesurant la viscosité dynamique d’esters d’acide oléique. De la même manière qu’avec les acides gras, la viscosité des esters augmente avec le nombre de carbones des alcools constitutifs (Figure I.3-12). Cet effet apparaît d’autant plus marqué lorsque la température des esters est basse.

Par ailleurs, l’introduction de ramifications dans la partie alcool des esters ne s’accompagne pas de variation substantielle de la viscosité des esters<sup>[81, 82]</sup>.

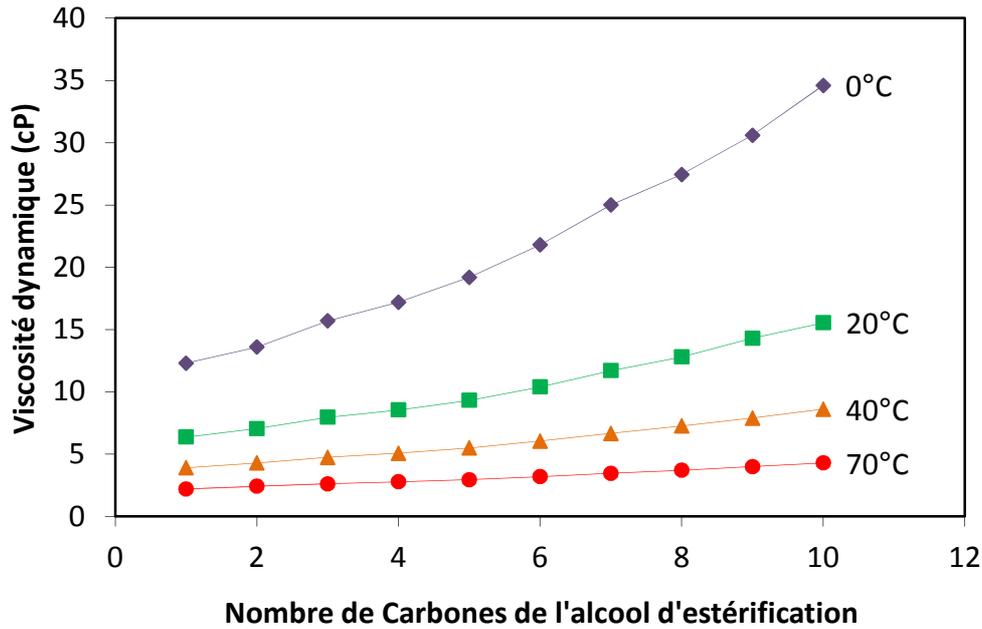


Figure I.3-12 : Effet du nombre de carbone de l'alcool d'estérification sur la viscosité dynamique (cP) d'esters de l'acide oléique en fonction de la température (°C) [79].

Les esters d'acides gras sont utilisés en mélange (synthèse à partir d'huile végétale contenant différents acides gras). Ainsi, la viscosité du mélange ne sera pas celle des esters purs mais une résultante de leur mélange. Allen et coll, 1999<sup>[81]</sup> utilisent la relation de Grunberg-Nissan (équation 20) pour établir des prédictions de viscosité des esters d'huiles végétales à partir de leur composition.

$$\ln \mu_m = \sum_i^n x_i \ln \mu_i + \sum_{i \neq j}^n \sum x_i x_j G_{ij} \quad (\text{Eq. I-20})$$

où  $\mu_m$  est la viscosité d'un mélange d'ester (Pa.s),  $\mu_i$  la viscosité du  $i^{\text{ème}}$  ester d'acide gras (Pa.s),  $x_i$  et  $x_j$ , les fractions molaires des  $i^{\text{ème}}$  et  $j^{\text{ème}}$  esters,  $G_{ij}$  un paramètre d'interaction entre composés et  $n$  le nombre d'esters. Dans le cas d'esters d'acide gras, l'ensemble des composants des mélanges sont très proches structurellement, ainsi le terme  $G_{ij}$  peut être

---

négligé et la viscosité de mélange d’ester peut se réduire à la somme pondérée de la viscosité des esters constitutifs.

#### I.3.3.4 Effet sur la stabilité oxydative.

L’oxydation des esters d’acides gras est très dépendante de la nature des acides gras qui composent les mélanges. En effet, un facteur important de la stabilité des esters d’acides gras est la présence de doubles liaisons (voir section I.2.4).

Knothe et Dunn, 2003<sup>[83]</sup> et Moser, 2009<sup>[84]</sup> mesurent la stabilité oxydative de composés purs. Les résultats de Knothe et Dunn, 2003<sup>[83]</sup> sont présentés dans la Table I.3-4. Ils remarquent que :

- la stabilité oxydative est hautement dépendante du nombre de doubles liaisons. Plus le nombre de doubles liaisons dans une série de composés (les C18 par exemple) est élevé, plus leur stabilité oxydative est faible. Ainsi, le temps de résistance à l’oxydation est nettement plus important pour l’oléate de méthyle (55,63h à 70°C) que pour le linoléate de méthyle (5,48h à 70°C).
- La position des doubles liaisons dans la chaîne carbonée a également une importance. D’après Moser, 2009<sup>[84]</sup>, la proximité entre l’insaturation et la fonction carboxylique de l’ester introduirait un effet répulsif stéréo-électronique durant la phase initiale de formation de radical.
- La configuration *trans* des doubles liaisons potentiellement présentes dans les résidus d’acides gras permet une stabilisation oxydative par rapport à la configuration *cis*.
- L’estérification des acides gras par un alcool (ou un glycérol) permet une stabilisation de l’ester.
- La nature de l’alcool d’estérification et notamment sa taille a une influence sur la stabilité oxydative. Par exemple, la résistance oxydative de l’oléate de butyle est 2,4 fois plus importante à 90°C que celle de l’oléate de méthyle.

**Table I.3-4 : Mesure de l’index de stabilité oxydative (OSI) (h) de 5g de composés lipidiques purs à 70°C et 90°C [83].**

Composé		OSI (h)	
		70°C	90°C
Palmitoléate de méthyle	C <sub>16:1</sub>	>90	22,06
Pétrosélinate de méthyle	C <sub>18:1</sub> Δ6	>90	14,86
Acide oléique	C <sub>18:1</sub> Δ9	38,82	6,63
Oléate de méthyle	C <sub>18:1</sub> Δ9	55,63	10,7
Oléate d'éthyle	C <sub>18:1</sub> Δ9	-	10,86
Oléate de propyle	C <sub>18:1</sub> Δ9	-	11,78
Oléate de butyle	C <sub>18:1</sub> Δ9	-	26,1
Trioléine		>90	17,4
Vaccénate de méthyle	C <sub>18:1</sub> Δ11	>90	15,86
Acide linoléique	C <sub>18:2</sub> Δ9,12	1,82	0,75
Linoélate de méthyle	C <sub>18:2</sub> Δ9,12	4,56	1,2
Linoléate de méthyle	C <sub>18:3</sub> Δ9,12,15	5,48	-
11-Eicosanoate de méthyle	C <sub>20:1</sub>	57,22	12,95
Erucate de méthyle	C <sub>22:1</sub>	59,46	13,86

Globalement, la stabilité oxydative des mélanges d’esters est dépendante de leur composition et donc de la matière première à partir de laquelle a été synthétisé le mélange. Ainsi, les huiles et esters présentant un taux d’insaturation faible seront plus stables que ceux présentant un taux plus élevé. Il est ainsi reconnu que les esters méthyliques d’huile de palme sont plus stables vis à vis des phénomènes d’oxydation que les esters méthyliques d’huiles de soja<sup>[84, 85]</sup>. De plus, il est possible d’ajuster la stabilité oxydative par le mélange d’esters issus d’huiles de différentes natures.

## **I.4 La biocatalyse au profit de la chimie verte.**

### **I.4.1 Biotechnologies blanches et biocatalyse.**

‘‘Biotechnologie blanche’’ est le terme qui a été donné pour qualifier les productions biotechnologiques de produits chimiques, de matières ou d’énergie utilisant des enzymes ou

---

des micro-organismes. La “Biocatalyse” est une restriction du terme à la seule application des enzymes. Micro-organismes et enzymes sont utilisés de nos jours dans de nombreux procédés pour la manufacture de produits aussi différents que des produits destinés au marché de la chimie (produits organiques, agrochimiques, et pharmaceutiques) que des produits destinés à l’alimentation et les bioplastiques. D’une manière générale, les enzymes isolées sont utilisées dans des réactions d’hydrolyse ou d’isomérisation, et les cellules entières dans des réactions de synthèse, impliquant la régénération de co-facteurs souvent très onéreuse. Même si cette régénération est possible *in vitro*, il est souvent préférable d’utiliser les voies métaboliques des cellules actives.

A titre d’exemple, peuvent être citées la production de sirop à haute teneur en fructose par action de la xylose isomérase qui catalyse l’isomérisation du D-Glucose en D-Fructose, ou encore la préparation de pénicilline semi synthétique catalysée par la pénicilline amidase<sup>[86]</sup>. Leur utilisation a été étendue à la chimie de spécialité, à la synthèse de polymères et même à la chimie lourde. Un aperçu de la place grandissante des enzymes dans l’industrie est la multiplication des brevets impliquant une enzyme dans une réaction d’intérêt. Panke et coll., 2004<sup>[87]</sup> recensent dans ce sens plus de 250 brevets postérieurs à l’année 2000 pour les productions de chimie fine (Table I.4-1).

Les hommes ont utilisé les enzymes sans même en avoir conscience depuis la nuit des temps essentiellement dans la conception de produits alimentaires (bières et cervoises, vins, vinaigres, fromages, charcuterie) ou encore dans le traitement des cuirs et des lins. Les procédés étaient alors essentiellement assurés par des micro-organismes ou des extraits cellulaires bruts. Ce n’est que vers 1930 que la nature protéique des enzymes a été établie, et

dès lors, il a été possible de les purifier, les caractériser, les cloner et déterminer leur structure tridimensionnelle.

**Table I.4-1 : Image de l’intérêt industriel pour la biocatalyse et de la biotransformation au travers de brevets d’intérêts publiés dans le domaine entre 2000 et 2004<sup>[87]</sup>.**

Classe de composés	Sous-division/Technologies identifiées	Nombre de brevets
Alcools	Réduction de cétones	35
	Résolution cinétique	13
	Condensation d'aldols	5
	Oxygénases	3
	Autres	1
Acides Aminés/Peptides	Hydrolyse de Carbamoyle/Hydantoine	17
	Hydrolyse d'amides	7
	Transamination	3
	Acides $\beta$ -aminés	5
	Synthèse de peptides par couplage cinétique	8
Acides	Autres	1
	Résolution d'esters	14
	Hydrolyse de nitrile.cyanohydrine	5
	Oxidation par oxygénases	4
	Acides par réactions catalysées par des lyases	3
	Résolution d'amides	2
Sucres	Autres	1
	Glycyltransférases/Oligosaccharides/Glycoconjugués	10
	Remodelage de glycoprotéines	9
	Monosaccharides activés	3
	Monosaccharides	1
Produits naturels complexes	Autres	4
	Antibiotiques	9
	Stéroïdes	5
Autres	Autres modifications de structures complexes	2
	Epoxydes/Péroxydes/Diols	9
	Amines	9
	Aldéhydes	6
	Cyanohydrines	6
Autres	5	

Les enzymes se sont dès lors révélées être un formidable outil pour l’industrie en devenant des catalyseurs souvent supérieurs aux catalyseurs classiques, capables d’accepter un spectre très étendu de substrats différents, de démontrer des spécificités accrues et même des

---

sélectivités de position (régio-sélectivité) et chirales (énantio-sélectivités). Les enzymes sont actives le plus souvent dans des solvants aqueux sous des conditions réactionnelles douces de température, pression et pH. Les sélectivités biocatalytiques accrues permettent en général de se passer d’étapes de protection/déprotection, qui sont utilisées en chimie classique. Elles permettent également une réduction substantielle des produits de réactions secondaires par l’utilisation de températures basses. Dès lors, les biotechnologies blanches et plus particulièrement la biocatalyse se rapprochent des principes de chimie verte et de développement durable qui ont été évoqués dans une section précédente (section I.1). Pour exemple, Thum et Oxenboll, 2008<sup>[88]</sup> évaluent le bénéfice écologique d’un procédé enzymatique de production d’esters d’acides gras à visée cosmétique : le bioprocédé permet une économie d’énergie de 60% et une émission de substances polluantes réduite de 90%.

Les procédés biocatalytiques diffèrent des procédés de chimie classique dans le sens où il est nécessaire de prendre en compte les cinétiques enzymatiques, la stabilité protéique en conditions de travail ou encore les milieux qui peuvent être complètement différents des conditions naturelles des catalyseurs. Le développement de tels procédés nécessite un cadre rationnel qui peut être schématisé au travers du cycle de la biocatalyse<sup>[86]</sup>. Un ou plusieurs biocatalyseurs doivent être identifiés et développés, un procédé doit être mis au point et la bioconversion résultante doit être optimale pour être économiquement viable. Comme le montre la figure I.4-1, cela peut faire appel à des spécialités très variées.

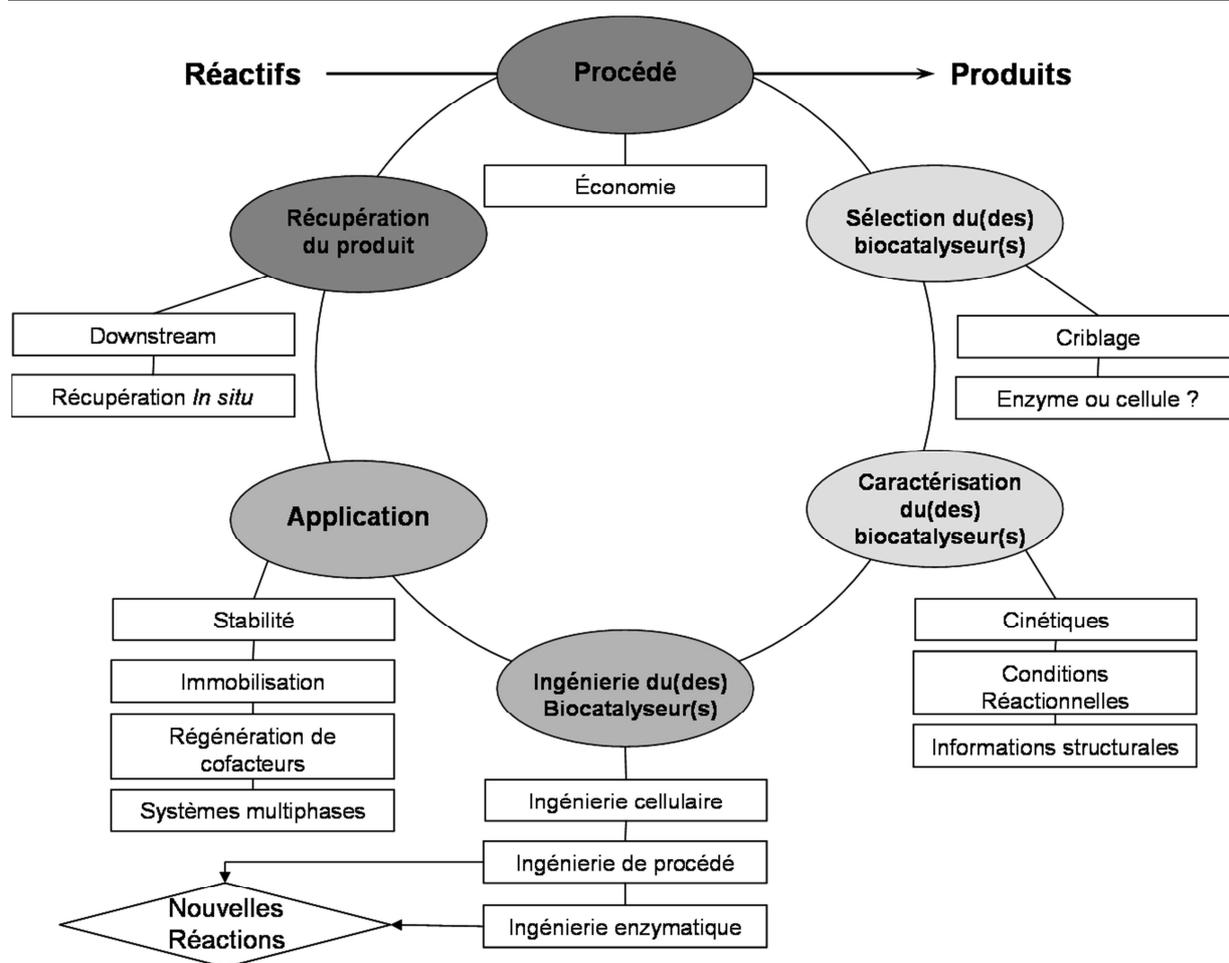


Figure I.4-1 : Représentation schématique du cycle de la biocatalyse <sup>[86]</sup>

#### I.4.2 Enzymes et milieux organiques.

Le fait que le milieu naturel des enzymes soit un milieu aqueux a longtemps restreint leur utilisation à quelques procédés peu nombreux. En effet, une grande partie des composés ne sont pas ou peu solubles dans l'eau et de fait ne peuvent être envisagés en tant que substrats potentiels. L'eau donne souvent lieu à des réactions parallèles indésirables ou dégrade les réactifs organiques. L'équilibre thermodynamique des réactions est défavorisé par la présence d'eau et la récupération des produits est souvent difficile<sup>[89]</sup>.

---

Des auteurs tels que Klibanov et coll., 1977<sup>[90]</sup> et Tarquis et coll., 1980<sup>[91]</sup> ont été des pionniers, pour démontrer la possibilité d’effectuer des réactions de synthèse dans un système contenant une phase eau et une phase organique non miscible. L’enzyme est localisée dans la phase aqueuse, tandis que les réactifs sont présents dans la phase organique. Les auteurs ont montré que la présence de solvant organique permettait de maintenir une faible activité du produit de la réaction (ester), et donc de déplacer l’équilibre thermodynamique vers des réactions de synthèse produisant elles-même de l’eau.

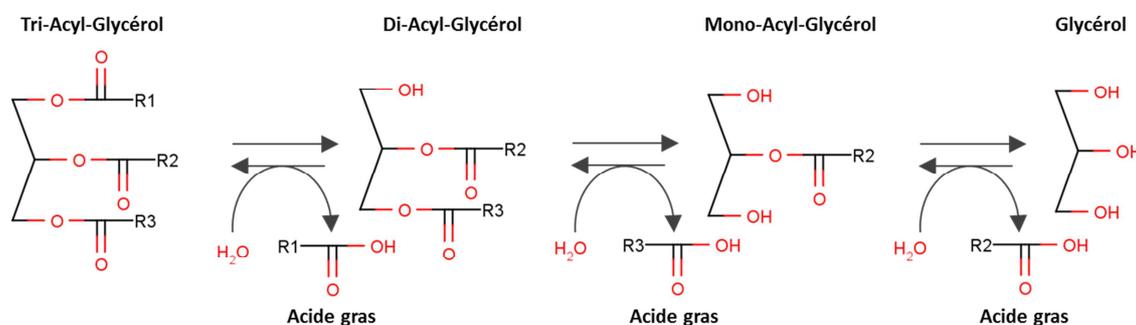
L’optique d’une véritable utilisation des enzymes dans des milieux non aqueux s’est réellement démocratisée lorsque Zaks et Klibanov <sup>[92, 93]</sup> ont démontré la robustesse de l’activité enzymatique dans des milieux purement organiques, qui peut être comparable aux activités obtenues en milieux aqueux. Ils démontrent également que les enzymes gagnent en stabilité, une fois placées dans un solvant organique. En effet, Zaks et Klibanov, 1984<sup>[92]</sup> décrivent la stabilité de la lipase pancréatique à 100°C durant de nombreuses heures dans un milieu constitué à 99% de solvants organiques, alors qu’elle n’est que de quelques secondes en milieux aqueux.

## **I.5 Les lipases.**

### **I.5.1 Réactions catalysées par les lipases.**

Les triacylglycérols acyl hydrolases (E.C.3.1.1.3), plus communément appelées lipases, sont des enzymes entrant dans le métabolisme des graisses. Elles sont très largement représentées dans le monde vivant car retrouvées dans tous les organismes allant du virus (où les enzymes ne sont que codées), aux micro-organismes et jusqu’aux êtres supérieurs (animaux et végétaux). Elles catalysent dans leur milieu naturel aqueux l’hydrolyse des liaisons esters des

triglycérides reliant les résidus d’acides gras au squelette carboné de glycérol (Figure I.5-1), dans le but de rendre disponibles les graisses en tant que source d’énergie pour les cellules.



**Figure I.5-1 : Réaction d’hydrolyse des Tri-Acyl-Glycérols par les lipases.**

Les lipases se distinguent de leurs cousines les carboxylestérases (EC.3.1.1.1) en catalysant préférentiellement des esters à longues chaînes carbonées ( $C > 10$ ) insolubles dans l’eau. Les esters hydrolysés peuvent être simples (esters linéaires) ou multiples dans le cas des triglycérides. La présence d’une interface formée entre les substrats hydrophobes et le milieu réactionnel est déterminante pour l’action des lipases. De ce fait, les lipases entrent dans une catégorie d’enzymes particulières capables d’agir en milieu biphasique, à l’interface entre les substrats hydrophobes et le milieu aqueux.

Au contraire, les carboxylestérases hydrolysent préférentiellement des esters simples (esters linéaires) solubles dans l’eau dont les résidus d’acides gras ont des chaînes courtes ( $C < 10$ ). Si l’inverse n’est pas vrai, les lipases sont également capables d’hydrolyser les substrats solubles, mais de manière moins efficace.

Si les triglycérides sont leurs substrats naturels, les lipases sont capables d’accepter un large spectre de substrats tels que des esters, des amides, des thioesters, des acides, des alcools, des amines ou des thiols. Selon les conditions thermodynamiques, les lipases sont susceptibles de

catalyser deux grandes catégories de réactions selon les conditions thermodynamiques : les réactions d’hydrolyse et les réactions de synthèse.

Les réactions de synthèse correspondent à la formation d’une liaison ester entre un acide gras et un alcool (estérification). La formation de liaisons esters n’est pas exclusive à cette seule réaction mais peut être étendue aux réactions impliquant :

- un acide gras et un ester (acidolyse)
- un ester et un alcool (alcoololyse)
- deux esters (transestérification et interestérification)

L’ensemble des réactions catalysées par les lipases est résumé dans la Figure I.5-2 suivante, chacune des réactions pouvant être réversibles.

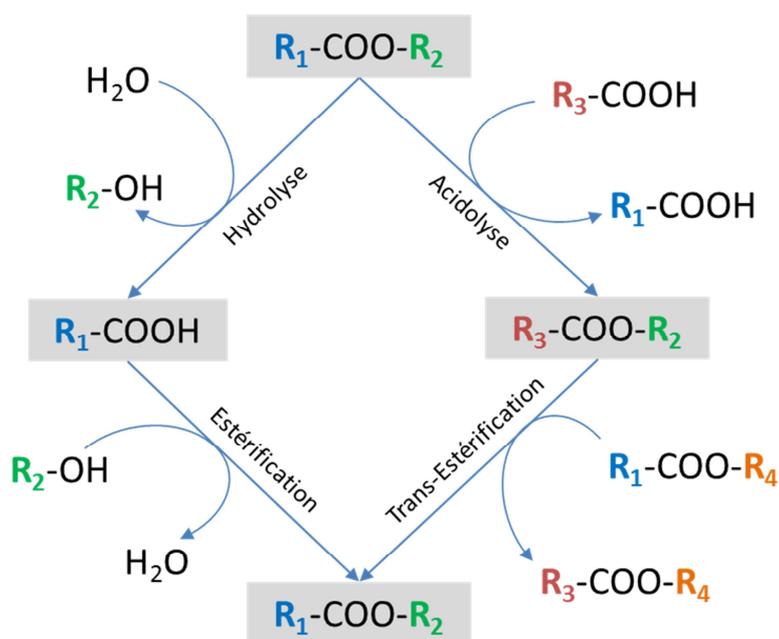


Figure I.5-2 : Réactions catalysées par les lipases.

Les lipases ont la particularité d’accepter un grand nombre de nucléophiles et donc, outre les liaisons esters, de pouvoir catalyser la formation de :

- liaisons amides à partir d’amine  $\text{-NH}_2$ <sup>[94]</sup>.
- liaisons thioesters à partir de thiols  $\text{-SH}$ <sup>[95, 96]</sup>.

---

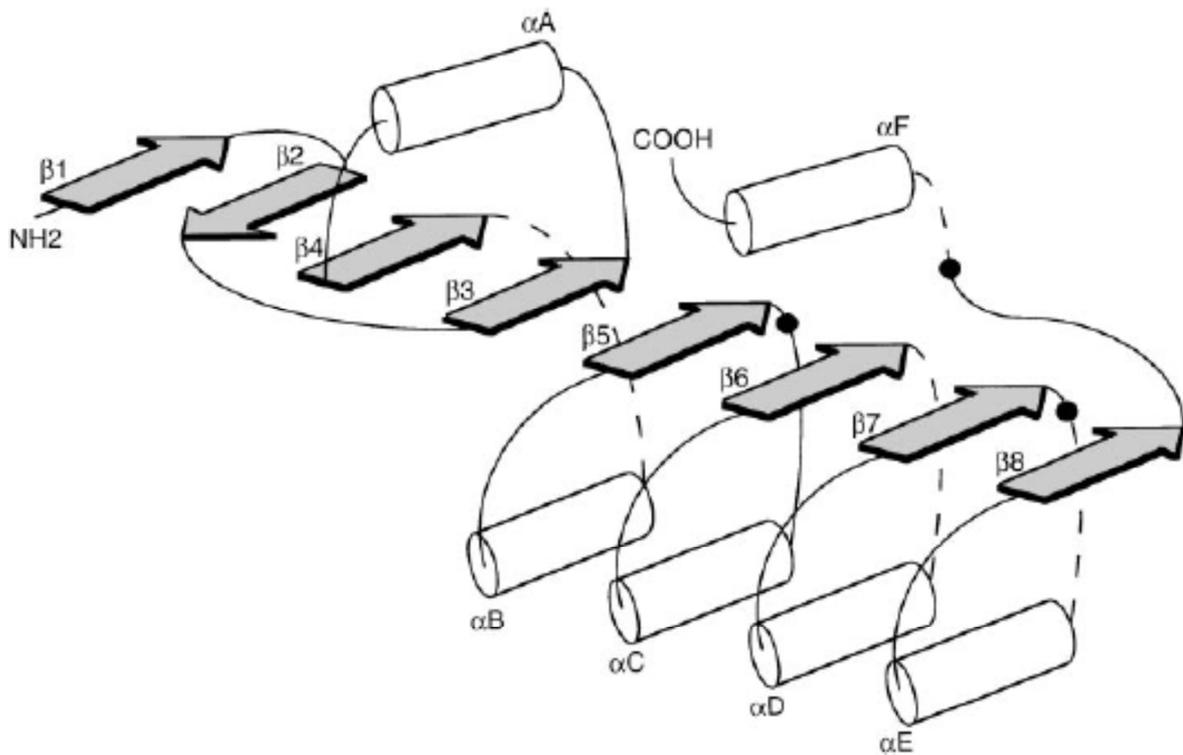
## I.5.2 Éléments de structure

Les travaux de résolution de structures tridimensionnelles des protéines sont très nombreux de nos jours. De nombreuses structures de lipases sont aujourd’hui résolues et donnent accès à de nombreuses informations structurales concernant ces enzymes.

Les lipases de *Rhizomucor miehei*<sup>[97]</sup> et la lipase pancréatique humaine<sup>[98]</sup> font partie des premières lipases de structure résolue. De nombreuses autres lipases ont ensuite suivi telles que les lipases de *Candida rugosa*<sup>[99]</sup>, *Candida antarctica*<sup>[100]</sup> ou encore *Thermomyces lanuginosa*<sup>[101]</sup>. A l’heure actuelle, la Protein Data Bank compte jusqu’à 73 entrées pour les seules lipases<sup>[102]</sup>. L’analyse de ces structures indique que les lipases adoptent un même motif structural appelé repliement  $\alpha/\beta$ .

### I.5.2.1 Le repliement $\alpha/\beta$

Ollis et coll. ont identifié pour la première fois un repliement de type  $\alpha/\beta$  chez les protéases<sup>[103]</sup>. Cette structure fut ensuite identifiée chez de nombreuses enzymes hydrolytiques (protéases à sérine et à cystéine, subtilysine, et les hydrolases à repliement  $\alpha/\beta$ ) dont les lipases. Ce repliement consiste en un feuillet  $\beta$  central, comportant 8 brins, dont seul le second brin  $\beta$  est antiparallèle. Les brins sont connectés par 6 hélices  $\alpha$  de part et d’autre du feuillet  $\beta$  (Figure I.5-3).



**Figure I.5-3: Repliement chez les  $\alpha/\beta$ hydrolases<sup>[103]</sup>** Les hélices  $\alpha$  sont représentées par des cylindres, les brins  $\beta$  sont indiqués par des flèches grisées. La position des résidus du site actif est représentée par un point noir, la serine catalytique est positionnée après le brin 5, le résidu Asp/Glu après le brin 7, et l’histidine est dans la boucle entre le brin 8 et l’hélice  $\alpha$ F. Si cette configuration est le repliement  $\alpha/\beta$  type, les structures des lipases peuvent varier selon l’enzyme considérée avec la présence ou l’absence de certains brins  $\beta$  ou d’hélice  $\alpha$ . Un motif minimum commun, néanmoins grandement conservé, est composé de 5 brins  $\beta$  parallèles dans le feuillet  $\beta$  central et deux hélices  $\alpha$  (B et C).

### I.5.2.2 Les résidus catalytiques des lipases

Toutes les lipases, et plus globalement les enzymes adoptant un repliement de type  $\alpha/\beta$  présentent un site actif composé de trois résidus catalytiques, placés invariablement dans l’ordre suivant dans la séquence protéique primaire :

- Un résidu nucléophile (sérine)
- Un résidu acide catalytique (acide aspartique ou acide glutamique)
- Un résidu histidine.

---

La sérine catalytique est située dans un motif pentapeptidique le plus hautement conservé (GX<sub>2</sub>SXG)<sup>[103]</sup>, qui forme un coude nucléophile (“nucleophile elbow”) entre le brin  $\beta$ 5 du feuillet central  $\beta$  et l’hélice  $\alpha$  suivante. Cette structure particulière permet à la sérine catalytique d’être positionnée à proximité de l’histidine de la triade, parfaitement en place pour effectuer les attaques nucléophiles nécessaires à la catalyse. Récemment, il a été montré une nouvelle classe d’enzymes présentant la sérine au sein d’un motif consensus particulier “GDSL” dans lequel on trouve par exemple la lipase de *Candida rugosa*<sup>[104]</sup>.

L’acide catalytique (Asp ou Glu) est situé après le brin  $\beta$ 7 du feuillet  $\beta$  (Figure I.5-3). Entre ce résidu et l’histidine de la triade, se crée une liaison hydrogène. Des variations topologiques de ce résidu peuvent être observées selon les lipases.

Le troisième résidu de la triade catalytique (histidine) prend place dans une boucle située après le brin  $\beta$ 8 dans le repliement  $\alpha/\beta$  de Ollis et coll, 1992<sup>[103]</sup>. La taille et la conformation de cette boucle sont variables.

### I.5.2.3 Le volet amphiphile.

Dès les premières études structurales des lipases, a été identifiée une structure recouvrant le site actif. Cette boucle amphiphile est appelée paupière ou volet amphiphile<sup>[97, 98]</sup>. Cette structure a la capacité d’être mobile et est à l’origine d’un changement conformationnel au contact d’une interface ou d’un substrat, pour rendre accessible le site actif. Deux formes de lipases peuvent donc co-exister : une forme fermée et une forme ouverte<sup>[101, 105]</sup>.

La présence d’une telle paupière serait à l’origine du phénomène d’activation interfaciale spécifique des lipases. En effet, l’activité des lipases est fortement augmentée lorsqu’elle est en présence d’une interface résultant de la présence d’un substrat insoluble sous forme d’émulsion plutôt que de la présence de ce même substrat en dessous de sa limite de solubilité (Figure I.5-4). Ce phénomène d’activation interfaciale caractérise d’ailleurs les lipases d’après Sarda et Desnuelles, 1958<sup>[106]</sup>.

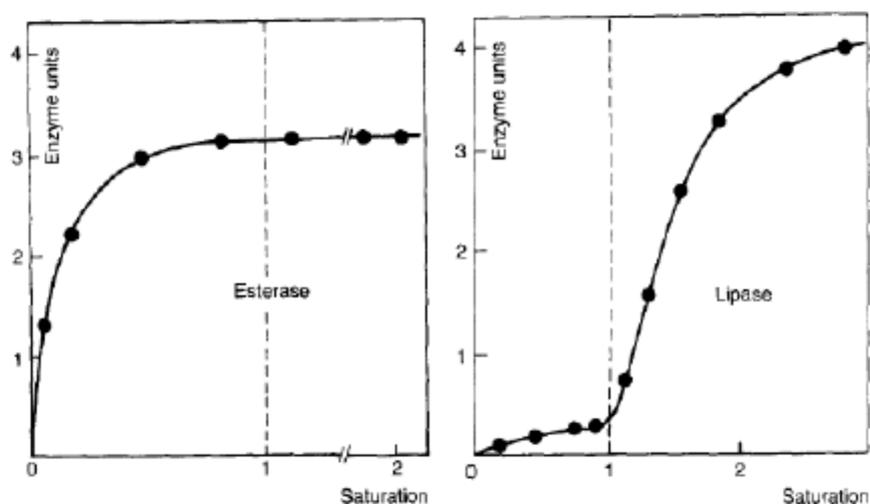


Figure I.5-4 : Taux d’hydrolyse de la triactéine partiellement soluble dans l’eau par les estérases et les lipases<sup>[106]</sup>. Les lignes pointillées représentent la limite de saturation du triester.

Ce phénomène s’explique par la fermeture de la paupière lorsque le substrat est en dessous de sa limite de solubilité. Lorsqu’une interface se crée, la paupière amphiphile est susceptible de s’ouvrir, entraînant une brusque augmentation de l’activité enzymatique. En revanche, si la forme fermée semble prédominer en milieu aqueux, Cygler and Schrag, 1997<sup>[107]</sup>, montrent que la forme ouverte serait la plus probable en milieu organique non aqueux.

#### I.5.2.4 Le trou oxyanion.

Lors du cycle de catalyse (voir section I.5.3), les deux intermédiaires tétraédriques sont stabilisés par la création de liaisons hydrogènes avec l’azote des groupes amides de deux acides aminés. Les acides aminés impliqués sont dits “du trou oxyanion”. Le premier acide aminé est invariablement le résidu X2 de la séquence consensus contenant la sérine de la triade catalytique (G-X1-S-X2-G) positionnée au niveau du coude nucléophile.

---

Pleiss et coll., 2000<sup>[108]</sup> décrivent deux types de trou oxyanion chez les  $\alpha/\beta$  hydrolases et plus particulièrement les lipases :

- Les trous oxyanion de type GX. Chez les enzymes présentant un type GX, est retrouvé un résidu dit d’amarrage qui interagit avec la chaîne latérale du résidu du trou oxyanion. Les lipases de *Rhizomucor miehei*, de *Thermomyces lanuginosa* et de *Yarrowia lipolytica* sont dotées de ce type de trou oxyanion.
- Les trous oxyanion de type GGGX,

Si la structure des résidus constituant le trou oxyanion est variable, la position des atomes d’hydrogène le composant est similaire. Ainsi, la fonction de stabilisation des intermédiaires tétraédriques est conservée.

Il semblerait que le type de trou oxyanion soit impliqué dans le processus de spécificité de substrats des lipases : les trous oxyanion de type GGGX seraient plutôt présents chez les carboxylestérases et les lipases spécifiques des courtes chaînes carbonées alors que les lipases de type GX auraient une spécificité marquée pour les substrats à longues chaînes carbonées.

Fischer et coll, 2006<sup>[109]</sup> ont introduit la notion d’un troisième type de trou oxyanion chez les  $\alpha/\beta$  hydrolases dans lequel n’est pas impliqué un groupement amide de résidu de la chaîne protéique mais l’hydroxyle de la chaîne latérale d’une Tyrosine. On parle de trou oxyanion de ‘‘type Y’’. Un tel trou oxyanion concerne essentiellement des peptidases et estérases et des protéines dont la structure s’approche de celle de la lipase A de *Candida antarctica*.

### I.5.3 Mécanisme catalytique

Cygler et coll. 1994<sup>[110]</sup> proposent un mécanisme catalytique pour les lipases, très proche de celui des protéases à sérine. Comme exposé précédemment, le site actif des lipases se compose de trois acides aminés :

- une sérine
- une histidine
- un acide aspartique (ou glutamique)

Le pKa de la sérine est normalement de 13 ; elle ne peut être normalement déprotonée pour assurer une attaque nucléophile (Figure I.5-5). La sérine se trouve positionnée dans le site catalytique à proximité d’une histidine (pKa normal de 6) rendue très basique par l’interaction de son second azote du groupe imidazole avec le dernier acide aminé de la triade, l’acide aspartique (ou glutamique). Cette interaction permet une grande stabilisation de la charge de l’histidine. Ainsi un proton de la sérine catalytique est accepté par l’histidine stabilisée. La sérine déprotonée devient extrêmement réactive et peut assurer son rôle dans le cycle de catalyse.

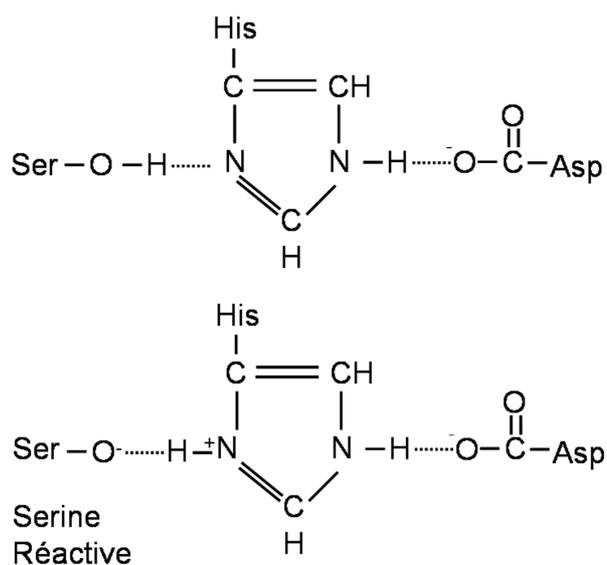


Figure I.5-5 : mécanisme d’activation de la sérine catalytique chez les  $\alpha/\beta$  hydrolases.

---

Ce processus catalytique, présenté dans la Figure I.5-6, se décompose en deux grandes étapes dites d’acylation et de désacylation.

#### I.5.3.1 L’étape d’acylation.

L’enzyme dans son état libre (étape 1) rencontre son ester substrat. La catalyse peut débuter par l’attaque nucléophile de l’atome d’oxygène porté par le résidu Sérine de la triade catalytique sur le carbonyle de la liaison ester substrat (étape 2). Se forme un “premier intermédiaire tétraédrique” (étape 3) caractérisé par :

- la présence d’une charge négative sur l’atome d’oxygène du carbonyle. On parle d’oxyanion.
- 4 atomes lié au carbonyle arrangé sous la forme d’un tétraèdre.

L’intermédiaire est stabilisé par la création de 5 liaisons hydrogènes dont 2 au moins sont établies avec les fonctions amides des résidus du trou oxyanion (étape 3). Le transfert d’un proton depuis la sérine catalytique sur l’histidine catalytique renforce le caractère nucléophile de la sérine. Ce transfert est facilité par la proximité de l’acide catalytique qui oriente précisément le cycle imidazole de l’histidine et neutralise partiellement la charge portée par celui-ci. Par la suite, un proton est donné à l’oxygène de la liaison en cours de rupture qui est ainsi clivée (étape 4). A ce stade, la partie acide du substrat est estérifiée sur la sérine catalytique, le complexe acyl-enzyme est formé et le premier produit de la réaction (alcool) est libéré (étape 5).

#### I.5.3.2 L’étape de désacylation.

Cette étape de désacylation fait intervenir une attaque nucléophile, qui peut être exercée par une molécule d’eau (hydrolyse), ou par un alcool (synthèse – estérification) sur le carbonyle de l’acyl-enzyme. L’histidine du site catalytique active cette attaque en retirant un hydrogène

de la fonction  $-OH$ . L’ion  $RO^-$  ainsi formé va attaquer le carbonyle du groupe acyle, lié de façon covalente à la sérine catalytique (étape 6). Un second intermédiaire tétraédrique est créé. Il est chargé négativement et est stabilisé par interactions avec le trou oxyanion (étape 7). Le transfert d’un proton de l’histidine catalytique sur l’atome d’oxygène de la sérine catalytique provoque la libération du second produit de réaction (acide carboxylique ou ester) (étape 8) permettant le retour de l’enzyme à sa forme native.

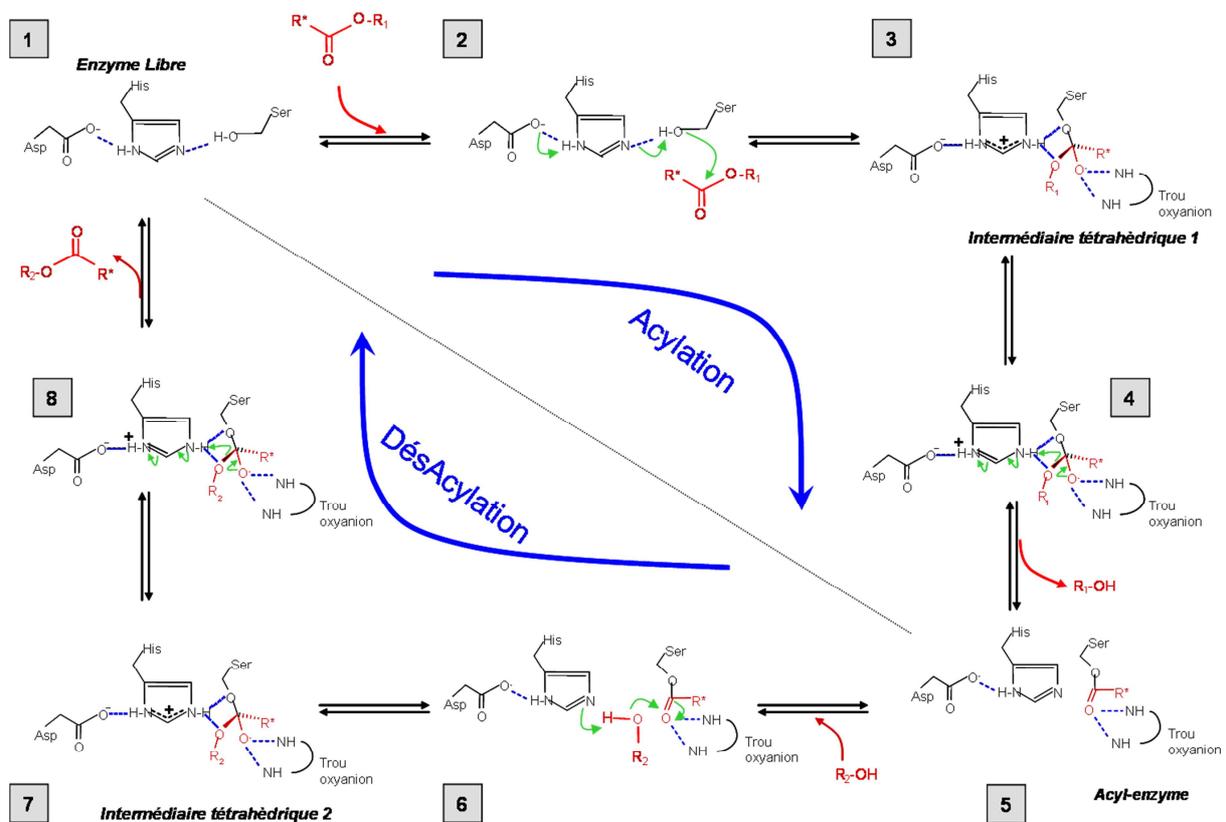


Figure I.5-6: Mécanisme catalytique des lipases <sup>[110]</sup>.

#### I.5.4 Classification des lipases.

Plusieurs niveaux de classification des lipases ont été envisagés :

- En fonction de leur organisme de provenance. on distingue les lipases de mammifère, les lipases végétales, les lipases fongiques et les lipases microbiennes. Cependant, une

---

telle classification des lipases masque les caractéristiques et similarités qui peuvent exister entre les protéines au niveau de leurs séquences et structures tridimensionnelles.

- En fonction de leurs propriétés biochimiques telles que leur spécificité de substrats, leur optimum de pH ou de température, leur stabilité etc.
- En fonction de d’alignement de séquences et d’analyses phylogénétiques.

Plusieurs classifications des lipases ont été proposées sur la base des structures des protéines :

- Arpigny et Jaegger, 1999<sup>[111]</sup> proposent une classification de 53 lipases et estérases bactériennes basée essentiellement sur leurs séquences d’acides aminés et certaines de leurs propriétés biologiques fondamentales. Il résulte de ces comparaisons la définition de 8 familles distinctes dont la première dite des “vraies lipases” est divisée en 6 sous classes.
- Pleiss et coll., 2000<sup>[108]</sup> ont développé une base de données regroupant les séquences de lipases microbiennes et d’hydrolases à sérine homologues : la “Lipase Engineering Database” LED. La base de données a ensuite été étendue à l’ensemble des hydrolases  $\alpha/\beta$ <sup>[109, 112, 113]</sup> et est de loin la classification la plus aboutie. Des critères de fonctions biologiques, d’alignement de séquence, de comparaison de structures secondaires ou encore de superpositions de structures tertiaires ont été utilisés pour analyser 6138 séquences représentant pas moins de 4322 protéines dont 594 structures tri-dimensionnelles sont connues. Les auteurs ont regroupé ces protéines en familles homologues, elles-mêmes regroupées en superfamilles quand les résidus de la triade catalytique sont présents strictement à la même place dans la séquence protéique. 37 superfamilles ont ainsi été définies rassemblant 103 familles homologues (Figure

---

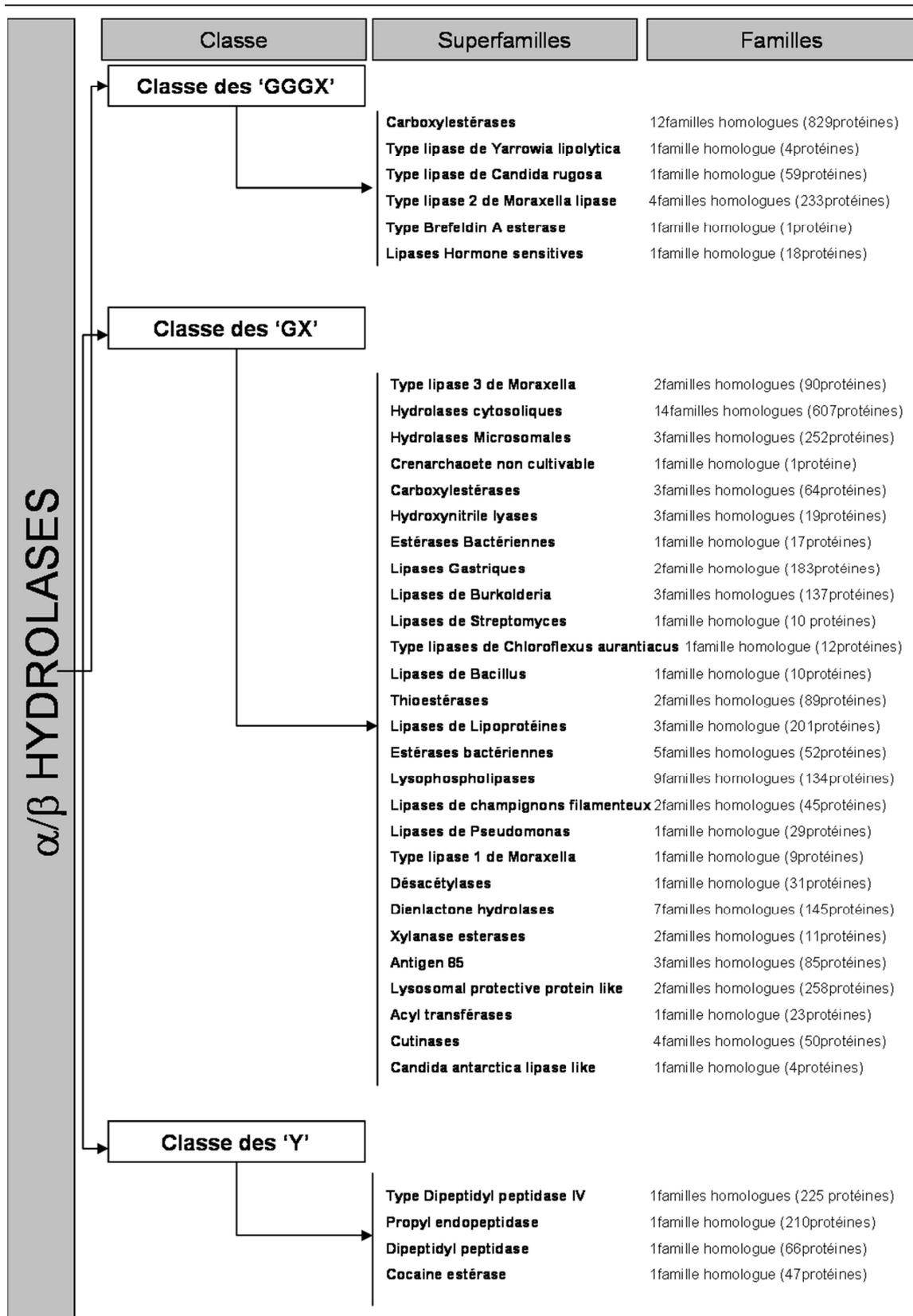
I.5-7). Les superfamilles se répartissent en trois grandes classes de protéines selon la configuration de leur trou oxyanion.

- Kang et coll, 2006<sup>[114]</sup> ont présenté une base de données regroupant 402 carboxylestérases et 481 lipases provenant de 257 souches microbiennes différentes (MELDB = Microbial Esterase and Lipase DataBase). Les enzymes ont été classées selon leur similarité de séquences. D’une façon générale, le groupage correspond à celui de la LED. Cependant, des différences apparaissent dans les sous-groupes.

### **I.5.5 Les spécificités des lipases**

Les sélectivités et spécificités des lipases font l’objet de nombreux travaux pour leurs intérêts industriels. Plusieurs types de spécificités sont recensés :

- la sélectivité concernant la nature de l’acylglycérol (tri-, di-, monoacylglycérol)
- la typosélectivité concernant la nature de la chaîne carbonée (longueur de chaîne ou nombre de doubles liaisons).
- la régiosélectivité concernant la position de la liaison ester sur le triglycérider (sn1, sn2 ou sn3).
- la stéréosélectivité faisant référence à la capacité de distinguer deux énantiomères ou deux molécules pro-chirales.

Figure I.5-7 : Classification des α/β Hydrolases<sup>[115]</sup>.

### I.5.5.1 La typosélectivité

La typosélectivité des lipases est extrêmement étudiée du fait de ses implications industrielles potentielles <sup>[116-126]</sup>. Elle représente la capacité des lipases à différencier les acides gras selon leurs caractéristiques intrinsèques. On distingue la sélectivité vis-à-vis :

- De la longueur de la chaîne carbonée d’acide gras.
- du degré d’insaturation contenu dans la chaîne carbonée ou leurs positions dans celle-ci.
- de la présence éventuelle de substituants dans le cas par exemple d’acides gras hydroxylés (acide ricinoléique).

Par exemple, Arsan et parkin, 2000<sup>[116]</sup> définissent que l’optimum réactionnel de la lipase de *Rhizomucor miehei* est obtenu pour des substrats de longueurs de chaînes C8, C14 et C16. Fu et Parkin, 2004<sup>[118]</sup> et Chang et Coll, 1999<sup>[117]</sup> montrent la préférence de la lipase de *Pseudomonas cepacia* pour les acides à chaînes moyennes (C8, C10 et C16). La lipase B de *Candida antarctica* (Novozyme<sup>®</sup> 435) présente, quant à elle, une préférence pour les acides gras à chaîne contenant 6 ou 10 carbones<sup>[117]</sup>. La lipase Lip2 de *Yarrowia lipolytica* a été qualifiée de véritable lipase car sa préférence est marquée pour les acides gras à chaînes longues (C18)<sup>[127]</sup>. A ce jour, aucune lipase n’a été décrite comme possédant une spécificité totale pour un acide gras particulier <sup>[125]</sup>.

Au même titre que les acides gras, les lipases sont susceptibles de différencier les alcools co-substrats de réactions de synthèse, ce qui permet d’étendre le terme de typosélectivité à ces alcools<sup>[128]</sup>.

D’un point de vue structural, la typosélectivité des lipases prend naissance dans la géométrie de leur site actif (site de fixation de la partie alcool et acide d’esters). Dans ce sens, Pleiss et

---

coll, 1998<sup>[123]</sup> définissent trois catégories de lipases en fonction de la topologie de leur site actif (Figure I.5-8) :

- les lipases présentant une cavité hydrophobe proche de la surface (lipase fongique de type *Rhizomucor miehei*).
- les lipases présentant un site actif au fond d’un entonnoir (lipases de *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia*, la lipase pancréatique et la cutinase des mammifères).
- les lipases présentant un site actif en forme de tunnel (*Candida rugosa*).

Gaskin et coll, 2001<sup>[119]</sup> ont démontré la possibilité d’altérer la spécificité de la lipase de *Rhizomucor miehei* vis-à-vis de la longueur de chaîne des acides gras, par mutagenèse des acides aminés intervenant dans les zones de contact entre la chaîne carbonée et l’enzyme. Ils obtiennent ainsi une activité vis-à-vis des substrats à chaînes courtes (C4) augmentée d’un facteur 3 à 4 par rapport à des substrats à chaînes plus longues (C10).

De la même manière, Schmitt et coll. 2002<sup>[124]</sup>, parviennent en effectuant la mutagenèse des acides aminés constituant le site actif du tunnel de la lipase Lip1 de *Candida rugosa* à des changements de spécificité de substrats. A titre d’exemple, le profil de longueur de chaîne de la lipase de *Candida rugosa* varie des courtes aux longues chaînes (C18) avec une préférence marquée pour les C4, C8, C10 et C12. La mutation des résidus 246 et 413 situés au cœur du tunnel, modifie la préférence pour les seuls acides gras à chaînes courtes (< C8). De même, le remplacement du résidu d’acide aminé 410 situé au fond du tunnel peut quasiment abolir l’activité pour les chaînes carbonées de plus de 14 carbones.

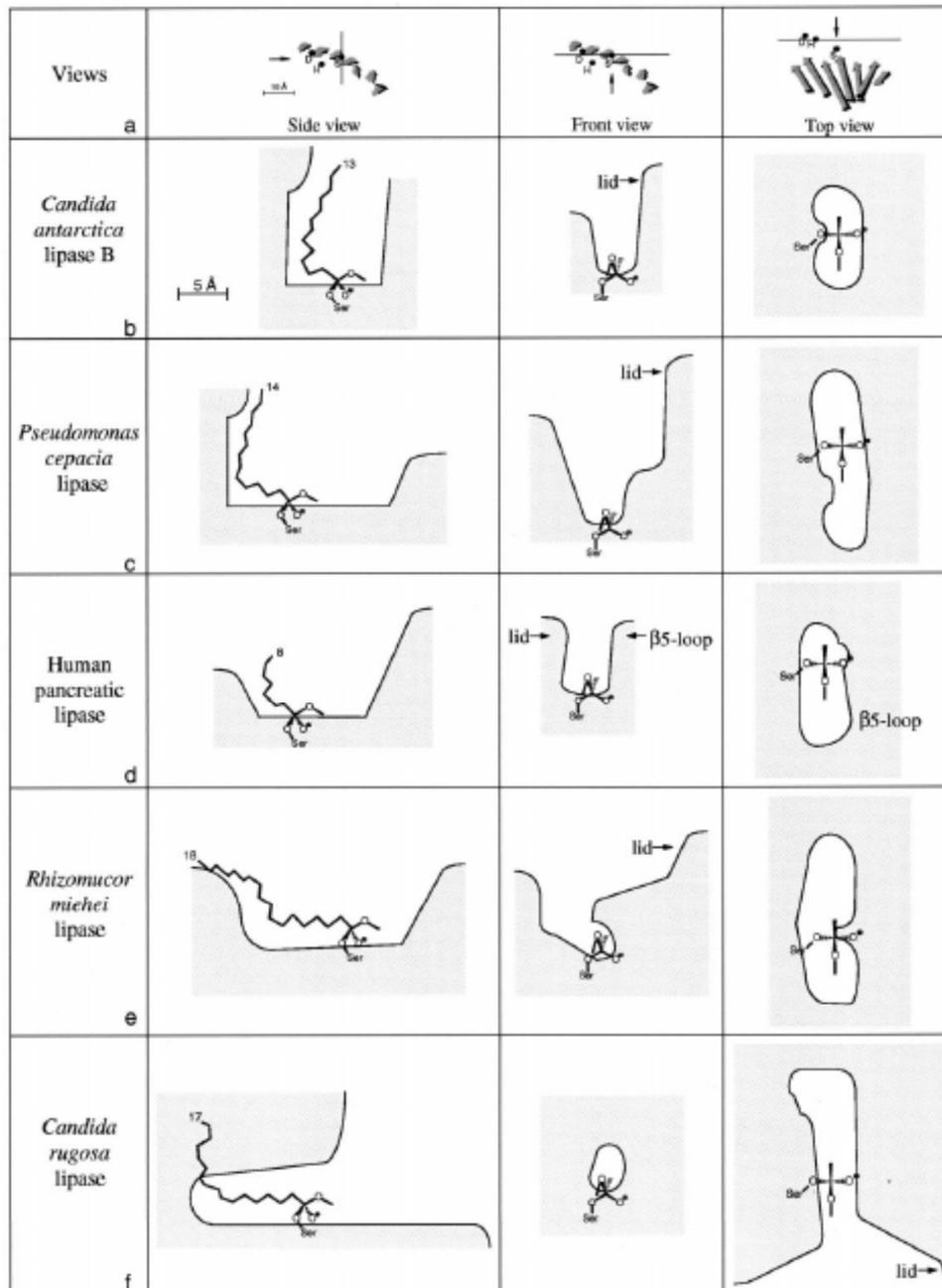


Figure I.5-8 : Représentation schématique des sites actifs des lipases de *Candida antarctica* (CALB), de *Burkholderia cepacia* (BCL=PCL), de *Rhizomucor miehei* (RML), et de *Candida rugosa* (CRL)<sup>[123]</sup>. (a) la direction des vues est indiquée par une flèche. D, Asp; H, His; S, Ser représentent les acides aminés de la triade catalytique. (b-e) Représentations des sites actifs : vue de côté, de face et de dessus. Les nombres indiquent la longueur des acides gras qui peuvent se lier complètement à l’intérieur du site actif.

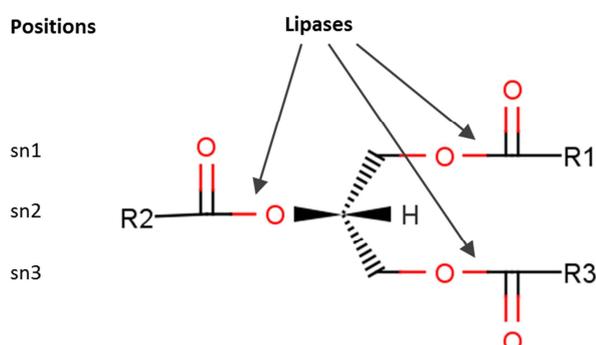
D’après Vaysse et coll, 2002<sup>[125]</sup>, les profils de spécificité vis-à-vis des acides gras peuvent varier selon les réactions considérées (estérification, hydrolyse ou transestérification). Ils expliquent en partie ces différences de spécificité par :

- la présence de substrats et co-substrats très variés dans les différentes réactions (esters ou acides, eau ou alcool)
- des conditions thermodynamiques différentes selon les réactions. Par exemple, dans le cas de l’hydrolyse, la solvation des acides gras à chaînes courtes favorise leur hydrolyse par rapport à des acides gras à chaînes longues.

Cela rejoint les observations de Janssen et coll., 1993<sup>[129]</sup> qui démontrent que la spécificité de synthèse d’acylglycérols avec des acides gras de longueurs de chaînes différentes est dépendante du solvant employé.

#### I.5.5.2 La régiosélectivité

La régiosélectivité correspond à la capacité des lipases à différencier les acides gras, selon leur position d’estérification sur le squelette de glycérol constituant le triglycéride (Figure I.5-9). Elle représente la capacité des lipases à distinguer les liaisons esters primaires (i.e. *sn1* et *sn3*) et les liaisons esters secondaires (i.e. *sn2*) d’une molécule de triacylglycérol.



**Figure I.5-9 : Représentation de Fisher d’une molécule de triacylglycérol. Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par les lipases.**

---

Classiquement, les lipases sont classées du fait de leur stéréosélectivité en trois groupes :

- lipases *sn1,3*-sélectives. C’est le cas des lipases de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), de *Rhizopus niveus*, de *Rhizopus oryzae* ou d’*Humicola sp.* <sup>[130]</sup>.
  
- Lipases *sn2*-sélectives. Très peu de représentants de lipases *sn2*-sélectives sont décrits dans la littérature. Seule la lipase A de *Candida antarctica* est reconnue comme étant *sn2*-sélective <sup>[131]</sup>. D’autres lipases ont été décrites comme étant *sn2*-sélectives mais leur capacité est discutée. C’est le cas de la lipase de *Candida parpsilopsis* par exemple <sup>[132, 133]</sup>.
  
- Lipases non sélectives. La lipase de *Candida rugosa* et la lipase B de *Candida antarctica* (Novozyme 435) sont reconnues comme étant non sélectives <sup>[134]</sup>.

La Table I.5-1 recense la spécificité de quelques lipases commerciales couramment retrouvées dans la littérature.

**Table I.5-1 : Spécificité, support et producteur de lipases commerciales usuelles<sup>[135]</sup>.** (NI : Non Immobilisé ; NS : Non Spécifique ; 1,3S : 1,3-Spécifique)

Lipase	Support	Fabricant	Spécificité
Lipase PS-D (lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> )	Célite 545	Amano Enzyme Inc.	NS
Lipase AK (lipase de <i>P. fluorescens</i> )	NI (poudre)	Amano Enzyme Inc.	NS
Lipase F-AB15 (lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> )	NI (poudre)	Amano Enzyme Inc.	1,3S
Novozyme 435 (lipase B de <i>Candida antarctica</i> )	Lewatit VP OC 1600	Novozymes A/S	NS
Lipozyme TL IM (lipase de <i>Thermomyces lanuginosa</i> )	Granule de silice	Novozymes A/S	1,3S
Lipozyme RM IM (lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> )	Duolite A568	Novozymes A/S	1,3S
Lipozyme CalB L (lipase B de <i>Candida antarctica</i> )	NI (Liquide)	Novozymes A/S	NS
Lipozyme MY (lipase de <i>Candida rugosa</i> )	NI (poudre)	Meïto Sangyo co., Ltd	NS
Lipozyme PL (lipase de <i>Alcaligenes sp.</i> )	NI (poudre)	Meïto Sangyo co., Ltd	1,3S
Lipozyme UL (lipase de <i>Rhizopus sp.</i> )	NI (poudre)	Meïto Sangyo co., Ltd	1,3S
Lipozyme AL (lipase de <i>Acromobacter sp.</i> )	NI (poudre)	Meïto Sangyo co., Ltd	1,3S

La classification des lipases dans une catégorie *sn1,3*-sélective peut être réductrice car les lipases sont susceptibles de différencier les positions *sn1* et *sn3* entre elles<sup>[136]</sup>.

Structurellement, la stéréopréférence de la lipase de *Burkholderia cepacia* s’explique par l’identification dans sa structure cristallographique de trois poches ou cavités pouvant accueillir les chaînes carbonées des acides gras en position *sn1*, *sn2* ou *sn3*<sup>[137]</sup> (Figure I.5-10). La taille et l’hydrophobicité de ces sites d’ancrage sont des déterminants de l’affinité pour les différentes positions des acides gras sur la molécule d’acylglycérol et apparaissent comme les facteurs déterminants de la stéréosélectivité de la lipase. Les interactions étroites entre l’enzyme et son substrat au niveau de la chaîne en position *sn2* et de l’histidine

catalytique laisse supposer l’importance de la cavité dans le processus de stéréopréférence de la lipase.

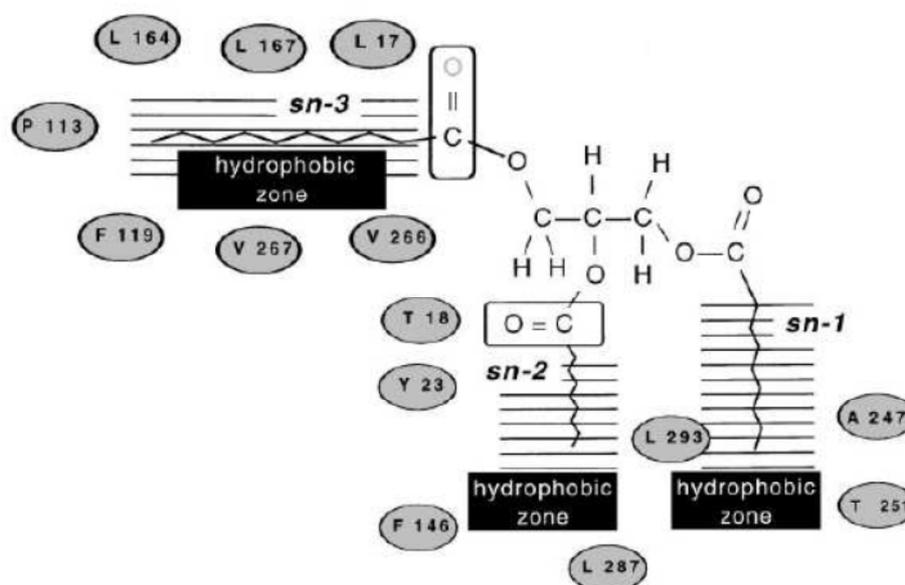
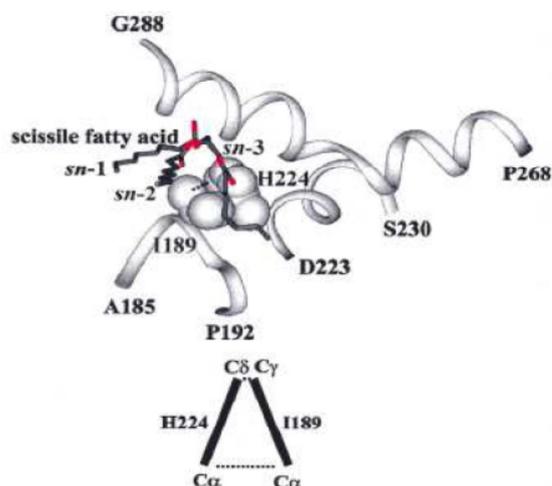


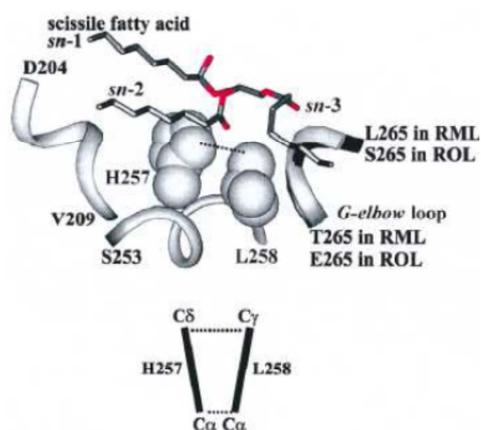
Figure I.5-10 : Site actif de la lipase de *Burkholderia cepacia*<sup>[138]</sup>. Les poches de liaisons aux groupements *sn1*, *sn2* et *sn3* sont indiquées ainsi que les acides aminés bordant ces poches.

L’importance de la position *sn2* et de l’histidine catalytique est reprise par Pleiss et coll, 2000<sup>[139]</sup> à travers une étude portant sur 4 lipases (celles de *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa*, et la lipase B de *Candida antarctica*). Les auteurs identifient un “*fossé histidine*” formé par l’histidine catalytique et un acide aminé différent selon la classe de la lipase considérée. La forme de ce fossé histidine et la flexibilité du substrat permettrait d’expliquer la stéréospécificité des lipases : le substituant *sn2* se positionne dans le fossé histidine et entre en contact direct avec l’acide aminé. Plus les interactions stériques sont intenses, plus la sélectivité se dirige vers la position *sn3*. Ainsi, la stéréosélectivité des lipases sera affectée soit par la rigidité du substituant *sn2*, soit par la forme du fossé histidine. Plusieurs cas de figures sont dès lors envisagés et résumés dans la Figure I.5-11.

Lipase	Fossé Histidine	Substrat	Stéréosélectivité	Figure n°
<i>C. antarctica</i> B	Etroit	Tout type	sn3	Figure I.5-11-A
<i>R. oryzae</i>	Moyen	flexible	sn1	Figure I.5-11-B
<i>R. oryzae</i>	Moyen	rigide	sn3	Figure I.5-11-B
<i>C. rugosa</i>	Large	Tout type	sn1	Figure I.5-11-C

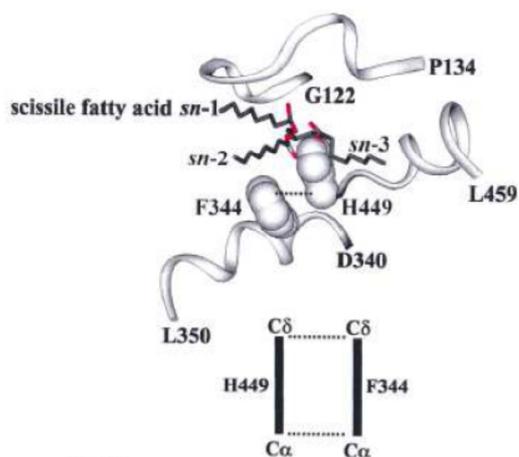


Lipase B de *C. antarctica* (gris clair) en complexe avec la triotcanoïne en orientation sn1. Le fossé histidine étroit entraîne des interactions stériques très importantes entre le substituant en sn2 et l’isoleucine 189. La position sn3 sera préférentiellement hydrolysée.



Lipase de *R. miehei* (gris clair) et *R. oryzae* en complexe avec la triotcanoïne en orientation sn1. Des contraintes stériques existent entre le groupement fonctionnel de la position sn2 et la leucine 258. La lipase de *R. miehei* favorisera la position sn1 quelque soit le substrat utilisé. Par contre la lipase de *R. oryzae* favorisera la position sn1 si le substituant porté par la position sn2 est flexible et sn3 si celui-ci est rigide

Figure I.5-11 : Représentation des différents types de fossés histidine<sup>[139]</sup>.



Lipase de *C. rugosa* (gris clair) en complexe avec la trioctanoïne en orientation sn1. Le fossé histidine est large, les interactions stériques entre le substituant en sn2 et la phénylalanine 344 sont faibles. La position sn1 sera préférentiellement hydrolysée.

Figure I.5-11 : Représentation des différents types de fossés histidine<sup>[139]</sup>. (Suite)

D’autres facteurs peuvent intervenir dans la stéréosélectivité des lipases, notamment :

- au niveau structurel, certaines boucles où la forme du site actif peuvent intervenir dans la stéréosélectivité des lipases<sup>[136]</sup>.
- au niveau thermodynamique, les solvants peuvent influencer la stéréosélectivité des lipases. Par exemple, la polarité (LogP) des solvants dans la synthèse de 1,3 DiOleyl-Glycérol par le Novozyme 435 peut influencer la stéréopréférence<sup>[140]</sup>.

### I.5.5.3 L’énantiosélectivité

Une autre propriété intéressante des lipases est de pouvoir différencier des molécules chirales. La chiralité est la propriété de tout objet qui n’est pas superposable à son image dans un miroir plan. Les deux formes *R* et *S* (l’objet et son image) sont dites énantiomères, ou encore appelées inverses optiques (Figure I.5-12).

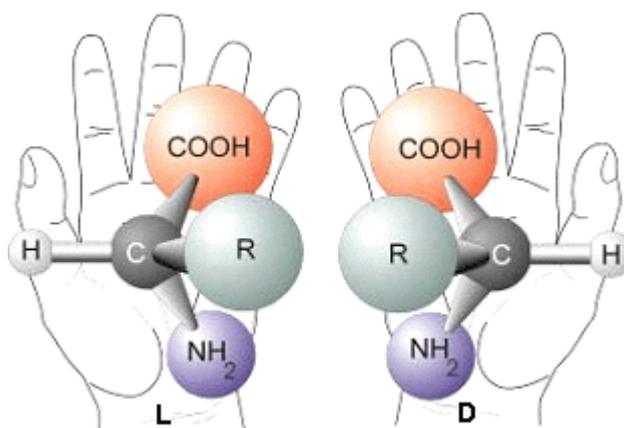


Figure I.5-12 : Exemple de molécules chirales.

Une faible différence structurale peut engendrer des propriétés biologiques différentes. En effet, un énantiomère peut être doué d’une propriété d’intérêt tandis que son inverse est inactif. Pire, le deuxième énantiomère peut être toxique. C’est par exemple le cas de la thalidomide dont l’un des énantiomères possède des propriétés antiémétiques, l’autre un effet tératogène puissant. La commercialisation de ce médicament sous forme de mélange racémique a conduit à la naissance de dizaines de milliers d’enfants malformés.

L’obtention de molécules énantiomériquement pures est donc un enjeu industriel de taille (chiffre d’affaire de 225 milliards d’euros en 2005 pour la seule industrie pharmaceutique)<sup>[141]</sup>. Les lipases sont un outil de choix dans cette quête. En effet, plusieurs auteurs décrivent la capacité des lipases à distinguer deux énantiomères. Les exemples de résolution de mélanges racémiques dans la littérature se multiplient (Table I.5-2).

Table I.5-2 : Exemples de résolution de mélanges racémiques par les lipases.

Lipase	Molécules	Méthodes	Intérêt Industriel	Références
Novozyme 435 (CalB)	Flurbiprofene	estérification	Anti-inflammatoire non stéroïdien	[142]
<i>Candida rugosa</i>	Baclofène (Acide (RS)-b-(aminométhyl)-4-chlorobenzène propionique)	--	Thérapie de la douleur Relaxant musculaire	[143]
<i>Yarrowia lipolytica</i> Lip2		hydrolyse		[127, 144]
<i>Burkholderia cepacia</i>	esters d'acide 2bromo toylacétique	estérification	intermédiaire de synthèse d'anti-inflammatoires, d'antibiotiques / pesticides	[145]
<i>Mucor miehei</i>		estérification		[145]
<i>Candida antarctica</i> lipase B				[146]
<i>Rhizopus oryzae</i>	(+/-) glycidyl butyrate	hydrolyse	précurseur de synthèse de produits chimiques et pharmaceutiques (β-bloquants)	[147]
<i>Rhizopus sp.</i>				[148]
<i>candida rugosa</i>	(+/-) menthol	estérification	confiserie , chewing gum, cosmétique, tabac, anesthésique local, analgésique	[149]
Novozyme 435 (CalB)	alcools aliphatiques allyliques secondaires	estérification	propriétés olfactives	[150]
<i>Burkholderia cepacia</i>		transestérification		

Une bonne illustration du mode d’action des lipases dans le processus d’énantiosélection est proposée au travers des ‘règles de Kazlauskas’, pour la résolution des mélanges racémiques d’alcools secondaires par les lipases<sup>[151]</sup>. Elle suppose que la base de l’énantiosélectivité repose sur la différence de taille entre les deux substituants de l’alcool secondaire. Cette règle suppose des poches de tailles différentes autour du site actif de l’enzyme où vont se loger les différents substituants de l’alcool secondaire. Dans le cas de la Figure I.5-13, le substituant de large taille a la priorité sur le substituant de taille moyenne ; c’est l’énantiomère R qui va réagir préférentiellement pour donner l’ester R correspondant.

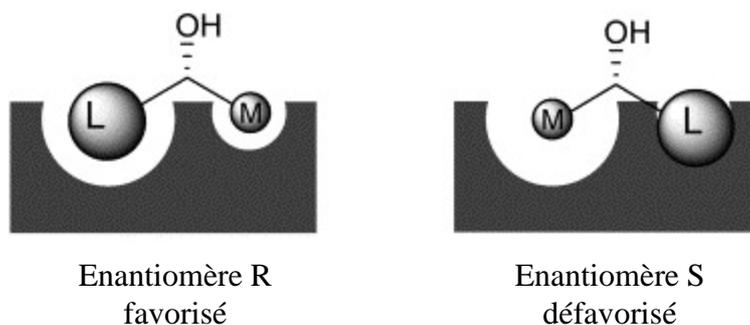


Figure I.5-13 : Règles de Kazlauskas pour la résolution enzymatique des alcools secondaires<sup>[151]</sup>. M : substituant de taille moyenne ; L : substituant de large taille.

## I.5.6 Mise en œuvre des lipases pour la synthèse d’esters d’acides gras.

### I.5.6.1 Immobilisation des lipases.

#### I.5.6.1.1 Généralités.

Même si une enzyme est identifiée comme active et efficace pour une certaine réaction, son utilisation industrielle est souvent restreinte par son manque de stabilité à long terme en condition de procédé, par les difficultés rencontrées lors de sa récupération et son recyclage. L’immobilisation est ainsi souvent la clé pour améliorer les performances d’une enzyme<sup>[152, 153]</sup>. Le terme d’“enzymes immobilisées” fut recommandé lors de la 1<sup>ère</sup> conférence de l’Enzyme Engineering en 1971. Elles se définissent comme “des enzymes confinées ou localisées dans une certaine région définie de l’espace avec rétention de leurs activités catalytiques, pouvant être utilisées de façon répétée et continue”.

Spécialement en milieu organique anhydre, il est très difficile d’utiliser les enzymes sans immobilisation, car les molécules d’enzymes ont tendance à s’agréger et sont donc soumises à

---

de fortes limitations de transfert de masse<sup>[154]</sup>. L’immobilisation représente ainsi un moyen d’augmenter la dispersion de l’enzyme dans les solvants organiques.

Les principaux avantages de l’immobilisation sont :

- l’enzyme devient moins sensible vis-à-vis de son environnement et plus stable. En particulier, immobiliser une enzyme permet le plus souvent d’augmenter grandement sa thermostabilité.
- elle est facilement séparable du mélange réactionnel et devient donc facilement réutilisable. De cette manière, elle est utilisable dans des systèmes de réacteurs continus.
- L’immobilisation permet également de prévenir la contamination du produit par l’enzyme elle-même. Cependant, des fuites d’enzyme peuvent devenir un problème lorsque l’enzyme n’est pas solidement fixée sur le support<sup>[155, 156]</sup>.

Une enzyme immobilisée doit assurer deux fonctions essentielles :

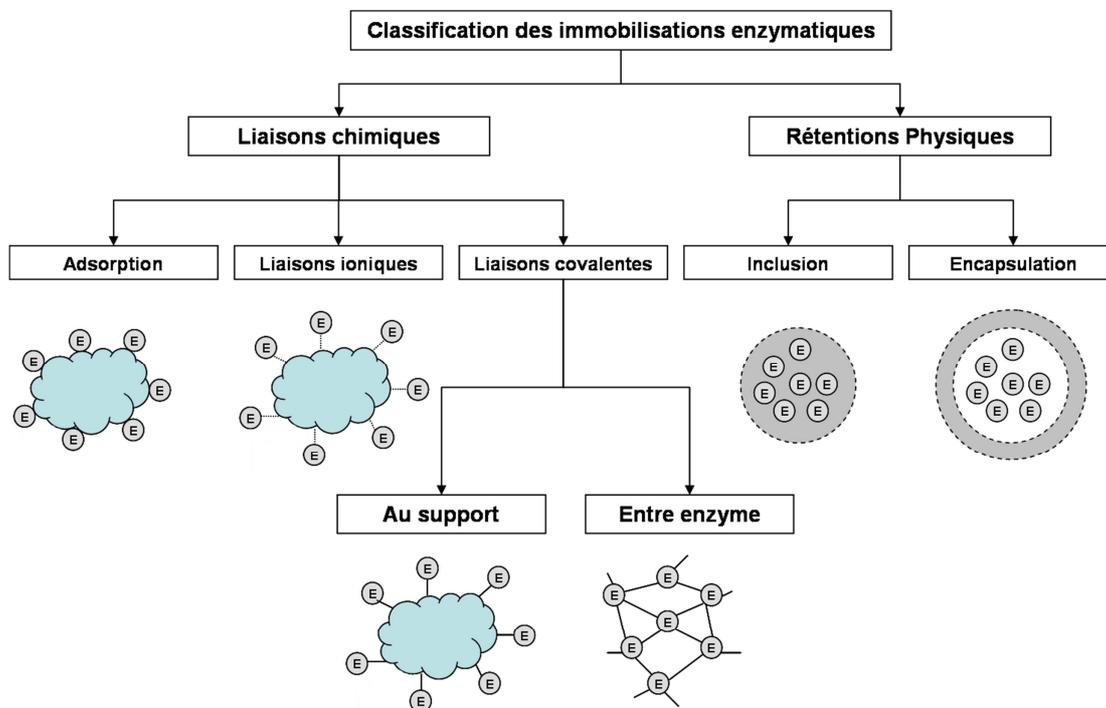
- une fonction non catalytique, qui doit être développée pour l’application. Elle doit assurer une certaine résistance mécanique et une résistance aux agents biologiques.
- Une fonction catalytique,

Il n’existe pas de méthode générale d’immobilisation des enzymes. Typiquement, une approche par tâtonnement est utilisée jusqu’à ce qu’un système satisfaisant soit développé. Comme le montre la Figure I.5-14, les techniques d’immobilisation les plus fréquemment utilisées peuvent être regroupées en deux grandes catégories, selon leur mode de rétention chimique ou physique. Se dégagent de ces deux catégories six méthodes principales d’immobilisation.

- 
- L’adsorption non covalente (voir section I.5.6.1.2).
  - L’immobilisation via des liaisons ioniques (voir section I.5.6.1.2).
  - L’immobilisation par liaisons covalentes à un support : l’enzyme est attachée par liaisons covalentes entre une ou plusieurs chaînes latérales d’acides aminés de la chaîne peptidique (amine primaire de la lysine, fonctions carboxyliques des acides glutamiques et aspartiques, hydroxyle de la sérine, tyrosine et thréonine, thiol de la cystéine), non impliqués dans la machinerie catalytique et la matrice solide. De nombreux supports organiques et minéraux peuvent être utilisés mais le support doit être activé avant immobilisation. Cette activation correspond à l’incorporation de groupements chimiques capables de réagir avec les chaînes latérales des protéines. Différentes méthodes d’activation sont connues mais la plupart utilisent des agents bifonctionnels tels que le glutaraldéhyde<sup>[157]</sup>.
  - La réticulation entre enzymes : cette technique d’immobilisation sans support physique consiste en la création de ponts covalents entre les chaînes latérales des acides aminés de la chaîne peptidique des enzymes entre elles. La réticulation chimique fait intervenir des agents bifonctionnels de pontage tels que le glutaraldéhyde.
  - L’inclusion dans une matrice de polymère : l’enzyme, contenue dans une phase de monomères, est emprisonnée après polymérisation dans le réseau formé. Si l’enzyme est retenue, substrats et produits sont capables de diffuser au sein du polymère. Les matrices les plus communément utilisés sont les gels de polyacrylamide, les gels d’alginate ou de carraghénanes (des polysaccharides provenant d’algues marines).
  - L’encapsulation dans une membrane poreuse. Cette technique consiste à créer des cellules artificielles délimitées par une membrane. Les molécules de grande taille

(enzymes) ne peuvent pas diffuser au travers de la membrane et sont donc retenues.

Les molécules de petites tailles (substrats et produits) peuvent franchir la membrane.



**Figure I.5-14 : Représentation schématique des procédés classiques d'immobilisation enzymatique.**

La solubilité des enzymes dans les milieux non aqueux est relativement limitée. Cela implique que les phénomènes de désorption des enzymes depuis les supports d'adsorption soient très limités dans ces conditions. Associée au fait que les procédures impliquées dans les immobilisations par adsorption non covalente font partie des plus simples, cette technique d'immobilisation par adsorption fait partie des immobilisations les plus utilisées pour les lipases<sup>[157]</sup>. L'immobilisation par adsorption non covalente est abordée plus en détail dans la section I.5.6.1.2 suivante.

### I.5.6.1.2 L’adsorption non covalente.

L’adsorption non covalente des enzymes sur des supports se fait par des forces de faible énergie telles que les interactions de Van der Waals, les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques etc. Il existe commercialement de nombreux supports d’immobilisation dont le choix va dépendre des propriétés intrinsèques pour l’application envisagée :

- Résistance mécanique.
- Stabilité chimique et physique.
- Caractère hydrophobe/hydrophile.
- Capacité d’adsorption.
- Coût.

La Table I.5-3 recense quelques uns des supports les plus fréquemment utilisés, des plus hydrophiles aux plus hydrophobes.

**Table I.5-3: Exemple de supports d’immobilisation des lipases commerciaux classiquement rencontrés dans la littérature.**

Nom	Fabricant	Matrice	type	Coût (€/L)	Références
Amberlite XAD4	Rhom&Haas	polystyrene divinylbenzene	Hydrophile	27	[158, 159]
Duolite A568	Rhom&Haas	condensat de Phenol formaldéhyde	Hydrophile	28	[160]
Granules de silice	--	Silice	Hydrophile	--	[161, 162]
Celite 545	Lehmann&Voss & co.	Cœur de Diatomée	Hydrophile	26	[163, 164]
Lewatit VP OC 1600	Lanxess	DVB méthacrylate	moyennement hydrophobe	27	[165, 166]
Accurel MP	Membrana GmbH	polypropylène	hydrophobe	4,8	[167-170]

---

L’efficacité d’adsorption dépend de différents paramètres propres à la fois à l’enzyme adsorbée et au support, ce qui rend chaque immobilisation unique<sup>[157]</sup>. Ces paramètres sont les suivants :

- la taille de la protéine
- l’aire spécifique du support : plus la surface spécifique du support est importante, plus la capacité d’adsorption est susceptible d’être grande.
- la nature de la surface du support (porosité et tortuosité). Une définition typique des gammes de taille des pores des supports est la suivante : micropores ( $< 20\text{Å}$ ) ; mésopores ( $20\text{-}500\text{ Å}$ ) ; macropores ( $> 500\text{Å}$ )<sup>[170]</sup>. L’immobilisation de la lipase de *Rhizomucor miehei* sur verre hydrophobe apparaît optimale pour un diamètre de pore d’au moins  $350\text{ Å}$ <sup>[171]</sup>. Les supports les plus efficaces se situent donc dans les gammes des mésoporeux et des macroporeux.
- le milieu d’immobilisation : pH, force ionique, addition de solvants miscibles à l’eau réduisant la solubilité de la protéine dans le milieu aqueux (acétone, éthanol)<sup>[157]</sup>.

Les équilibres d’adsorption ou isothermes d’adsorption, représentant la quantité d’enzyme adsorbée en fonction de la concentration en lipase résiduelle après immobilisation, permettent de décrire qualitativement les adsorptions. Ceci permet une évaluation des capacités et des affinités des supports pour les enzymes. Plusieurs modèles sont utilisés dans la littérature pour décrire les immobilisations d’enzymes par adsorption.

Le modèle le plus couramment utilisé dans la description des isothermes est celui de Langmuir<sup>[172]</sup>. Cette isotherme est obtenue lorsque l’enzyme forme une monocouche sur le support. Le modèle est basé sur la supposition d’un adsorbant structurellement homogène, où tous les sites d’adsorption sont identiques et énergétiquement équivalents. Ainsi, les supports

présentant ces caractéristiques portent un nombre égal de molécules, ce qui suppose une capacité d’adsorption finie. L’isotherme de Langmuir est présentée dans l’équation I-21 :

$$Q_e = \frac{K_L C_e}{1 + \alpha_L C_e} \quad (\text{Eq. I-21})$$

où  $Q_e$  représente la quantité de protéines immobilisées (g/g),  $C_e$  la concentration résiduelle d’enzymes dans le milieu,  $K_L$  et  $\alpha_L$  sont les constantes de Langmuir (L/g).  $K_L/\alpha_L$  représente la capacité d’adsorption maximale en monocouche du support.

Le modèle de Langmuir a été par exemple utilisé par Akova et Ustun, 2000<sup>[173]</sup> pour décrire l’adsorption de la lipase de la graine de *Nivella sativa* sur Célite ou par Al Duri et Yong, 2000<sup>[167]</sup> et Gitlesen et coll., 1996<sup>[174]</sup> pour l’étude de l’adsorption de différentes enzymes sur Accurel MP.

Un autre modèle utilisé dans la description des immobilisations par adsorption est celui proposé par Freundlich, 1906<sup>[175]</sup>. Il décrit des équilibres de surface énergétiquement hétérogène avec des sites d’adsorption non identiques et une distribution exponentielle de l’énergie d’adsorption sur la surface du support. Son expression est donnée dans l’équation I-22.

$$Q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (\text{Eq. I-22})$$

$K_F$  et  $1/n$  sont les constantes de Freundlich.

Mei et coll, 2003<sup>[176]</sup> montrent que la distribution des enzymes au sein des supports peut ne pas être régulière au sein de la particule de support. En effet, ils observent que la lipase B de *Candida antarctica* se situe dans une couche extérieure de la particule commerciale de

---

Novozyme 435 (Lewatit VP OC 1600) : On parle de distribution en ‘coquille d’œuf’. La taille de la couche de lipase est dépendante du temps de contact entre le support (et donc du temps de diffusion de la protéine dans le support) et de la concentration en protéine de la solution d’immobilisation.

Oliveira et coll, 2009<sup>[177]</sup> étendent ces observations et postulent que, pour des conditions d’immobilisation identiques, la taille de la coquille d’œuf est indépendante de la taille de la particule de support ; mais à l’inverse, le contenu spécifique en lipase est directement corrélé à la taille de la particule de support, les particules de petite taille ayant une teneur spécifique en protéine plus importante que les grandes. Il y a effet de dilution des lipases dans les supports de tailles croissantes.

#### I.5.6.2 Phénomènes de partage.

##### I.5.6.2.1 Milieus multiphasiques.

L’une des caractéristiques essentielles de la biocatalyse en milieu non conventionnel est la coexistence d’au minimum deux phases<sup>[178]</sup> :

- L’une de ces phases est le milieu réactionnel non aqueux à proprement parler et sert de ‘réservoir’ pour tout ou partie des produits et réactifs de la réaction.
- La seconde phase contient le biocatalyseur qu’il soit immobilisé, libre et agrégé ou dans une phase aqueuse.

Entre ces phases, existent une ou plusieurs interfaces dont les propriétés peuvent être très importantes pour le comportement cinétique. Les réactifs et/ou produits vont avoir à franchir cette interface entre la phase organique et le biocatalyseur. Si les interfaces ne contribuent pas thermodynamiquement à la plupart des équilibres thermodynamiques, elles sont néanmoins

---

responsables de phénomènes d’importance, tels que les phénomènes de limitations diffusionnelles.

#### I.5.6.2.2 Les limitations diffusionnelles.

Dans les systèmes mettant en oeuvre des enzymes immobilisées, des phénomènes de limitations diffusionnelles et de transfert de matière peuvent être observés. Yong et Al Duri, 1996<sup>[179]</sup>, montrent que, outre les capacités catalytiques de la lipase mise en jeu, la cinétique réactionnelle dépend d’un certain nombre de paramètres diffusionnels consécutifs:

- Le transfert du substrat de la phase liquide vers la surface du support, au travers d’une couche dite “limite”, mesuré par le coefficient de transfert de matière externe  $k_L$  ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ).
- La diffusion du substrat à l’intérieur de la particule de support, mesurée par la diffusivité intraparticulaire  $D$  ( $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ).
- La diffusion des produits néoformés à l’extérieur des particules de support.
- Le transfert des produits néoformés vers la phase liquide.

La Figure I.5-15 schématise l’accès des substrats au site actif de la lipase immobilisée sur un support présentant des phénomènes de limitations diffusionnels internes et externes. Les profils de concentrations, ici schématisés, montrent clairement les limitations aussi bien pour les substrats que pour les produits.

Les limitations diffusionnelles externes sont particulièrement bien illustrées par les travaux de Millqvist Fureby et coll, 1996<sup>[180]</sup>. Lors de la transestérification du caprate d’éthyle avec du glycérol, pour la synthèse de glycérides partiels, les auteurs montrent que plus la quantité de lipase de *Rhizopus arrhizus* immobilisée sur un support de polypropylène est augmentée dans le milieu réactionnel, plus l’activité spécifique (quantité de substrat transformé par unité de

lipase) est diminuée. Ils expliquent ce phénomène par un ralentissement du transfert du caprate d’éthyle vers le site actif et de la diffusion des produits de réaction vers la phase organique, dus à la création d’une couche de glycérol autour des particules de lipase.

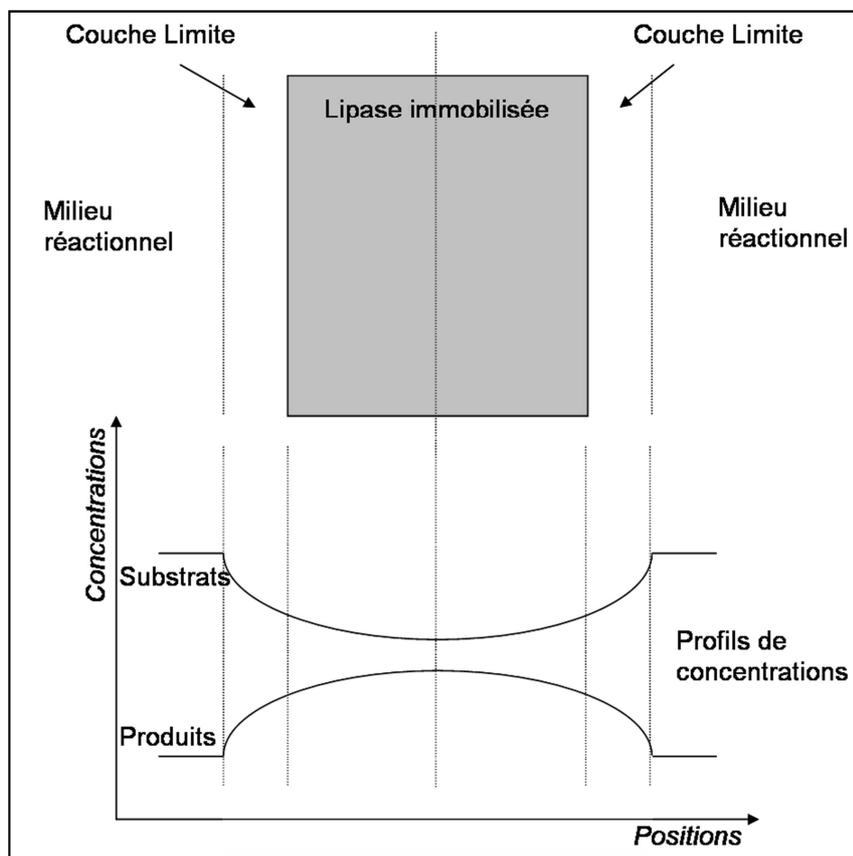


Figure I.5-15 : Schématisation des phénomènes de transfert rencontrés au cours des réactions mettant en œuvre une lipase immobilisée sur un support poreux<sup>[179]</sup>.

Les limitations internes sont très dépendantes du trio enzyme, support d’immobilisation et réactants mis en jeu lors des réactions. Torres et coll., 2007<sup>[165]</sup> ont étudié l’activité de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur Lewatit VP OC 1600 (Novozyme 435), sur Accurel MP et sur Purasorb pour la synthèse d’esters de tocophérols. Lors de réactions témoins avec des molécules de relativement petite taille (hydrolyse de la tributyrine ou transestérification du laurate de méthyle avec le propanol), le Novozyme 435 montre la plus forte activité. Par contre, lors de l’acétylation de l’ $\alpha$  tocophérol avec l’acétate de vinyle, c’est

---

la forme de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur Accurel qui fournit les meilleures performances. Les auteurs expliquent ces différences par une structure poreuse plus large de l’Accurel par rapport aux autres supports, facilitant la diffusion du substrat au sein du support solide.

De même, l’activité de la lipase de *Rhizomucor miehei*, immobilisée sur un support de verre hydrophobe de porosité contrôlée, est dépendante de la taille des pores<sup>[171]</sup> : des pores présentant un diamètre supérieur à 100nm sont nécessaires pour que l’activité soit indépendante de la taille des pores. Yong et Al Duri, 1996<sup>[181]</sup> préconisent l’utilisation de support dont les pores mesurent plus de 0,2µm, pour l’immobilisation de la lipase de *Rhizomucor miehei* sur support hydrophobe ESP2-2 afin de catalyser la réaction d’estérification de l’acide oléique avec l’octanol dans l’hexane. Enfin la diffusion au travers et au sein des supports est en partie régie par les interactions entre molécules et support<sup>[165, 176]</sup>.

#### I.5.6.2.3 Distribution de composés entre phases

L’optimisation thermodynamique d’une réaction de synthèse nécessite la compréhension des comportements des réactants en solution. Notamment en présence de systèmes multiphasiques, les différents composés impliqués dans la réaction (réactifs et produits) sont susceptibles de se partager entre les différentes phases<sup>[178]</sup>.

Les états d’équilibre entre phases sont régis par quelques grandes règles :

- à l’équilibre, la composition des deux phases est indépendante des volumes des phases.
- Si les concentrations de tous les composés sont connues dans une phase, à l’équilibre, elles sont toutes fixées dans l’autre mais peuvent être très différentes les unes des autres.

Halling, 1994<sup>[178]</sup> préconise l’utilisation des activités thermodynamiques pour l’analyse des systèmes biphasiques. Leur principal avantage est, qu’à l’équilibre, les activités thermodynamiques de chaque composé sont égales dans toutes les phases, même si leurs concentrations sont différentes.

L’activité thermodynamique d’une substance  $i$  représente une mesure de sa disponibilité dans le milieu et est définie par la relation I-23 suivante. L’activité du composé pur est considérée comme égale à l’unité et varie en solution de 0 à 1.

$$a_i = e^{\left(\frac{\mu_i - \mu_i^\theta}{RT}\right)} \quad (\text{Eq. I-23})$$

où  $\mu_i$  est le potentiel chimique du composé  $i$  dans les conditions considérées ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $\mu_i^\theta$  est le potentiel chimique du composé  $i$  dans les conditions standards ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $R$  est la constante des gaz parfaits ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) et  $T$  la température (K). Ainsi, l’activité thermodynamique est influencée par tous les facteurs pouvant faire varier le potentiel chimique de la substance, à savoir : température, pression, composition du milieu, nature du solvant etc...

Au sein de chaque phase, il est souvent plus utile de considérer les activités thermodynamiques en tant que produit d’un coefficient d’activité  $\gamma_i$  et d’une mesure de la quantité de l’espèce  $i$  considérée (concentration, molalité ou fraction molaire) (équation I-24).

$$a_i = \gamma_i \cdot x_i \quad (\text{Eq. I-24})$$

Dans les systèmes à l’équilibre constitué de deux phases A et B, il peut être écrit (équation I-25):

$$a_i^A = a_i^B \Leftrightarrow \gamma_i^A \cdot x_i^A = \gamma_i^B \cdot x_i^B \quad (\text{Eq. I-25})$$

---

Les concentrations du composé  $i$  dans les deux phases pouvant être très différentes, les coefficients d’activité  $\gamma_i^A$  et  $\gamma_i^B$  sont également très différents. Une forte concentration sera associée à un faible coefficient d’activité et inversement. Par ailleurs, les équilibres entre la phase organique du milieu réactionnel et le biocatalyseur sont totalement régis par les conditions de chacune des phases, c’est-à-dire leur composition notamment.

#### I.5.6.2.4 Distribution de l’eau entre phases : activité de l’eau.

Même si l’eau n’intervient pas en tant que telle dans la réaction de transestérification des huiles, le contrôle de son activité ( $a_w$ ) est un paramètre crucial dans les milieux non conventionnels. Le niveau d’hydratation de la lipase est un facteur clé de son activité. En effet, de nombreux auteurs relatent l’implication de l’eau dans le maintien de la structure, de la fonction et donc de l’activité des lipases. De nombreux auteurs montrent par exemple que le niveau d’eau est un facteur primordial dans l’optimisation des réactions catalysées par les lipases [182, 183].

Le comportement vis-à-vis de l’hydratation est propre à chaque lipase. L’activité de certaines d’entre elles augmente de façon monotone au fur et à mesure que l’activité de l’eau augmente. C’est par exemple le cas de la lipase de *Pseudomonas sp*<sup>[184]</sup>. D’autres présentent des optima d’activité selon l’ $a_w$ . C’est par exemple le cas de la lipase de *Rhizopus arrhizus* ou *Candida rugosa* qui présentent un maximum d’activité pour une  $a_w$  de 0,35 et 0,52 respectivement<sup>[184]</sup>. Certaines lipases, au contraire, présentent une activité très importante à de très faibles valeurs d’activité de l’eau et ne nécessitent pas d’apport d’eau extérieure (Figure I.5-16). C’est le cas, par exemple, de la lipase de *Candida antarctica* qui possède une activité optimale pour des activités de l’eau très faibles. En effet, Bousquet-Dubouch et coll, 2001<sup>[185]</sup> décrivent des activités optimales pour cette lipase à des  $a_w$  inférieures à 0,1.

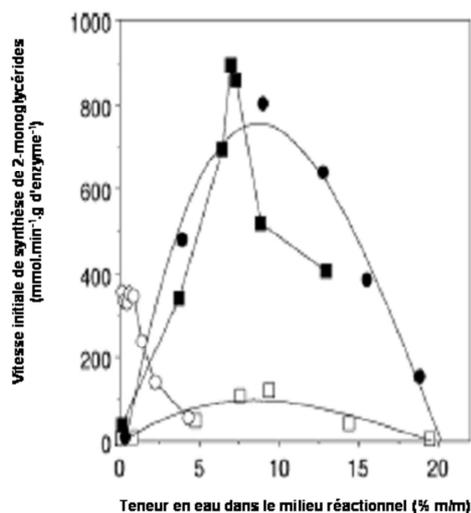


Figure I.5-16 : Effet de la teneur en eau ( $a_w$ ) sur l’activité de synthèse de 2-monoglycérides lors de l’éthanolysse de triglycérides catalysée par la lipase de *Candida antarctica B* (Novozyme 435) (○), de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) (□), de *Bulkorderia cepacia* (Lipase PS C-I) (●) et *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL IM) (■)<sup>[186]</sup>.

En revanche, les optima d’hydratation ne sont pas dépendants de la réaction considérée. En effet, Wetje et Aldercreutz, 1997<sup>[187]</sup>, obtiennent des profils d’activité de l’eau semblables quelle que soit la réaction (estérification, hydrolyse ou transestérification) avec les lipases de *Rhizopus arrhizus*, *Pseudomonas sp.*, *Candida rugosa* et le Lipozyme RM IM.

Dans le contrôle de l’ $a_w$ , deux facteurs principaux sont à prendre en compte :

- Le solvant. La quantité d’eau nécessaire pour obtenir une  $a_w$  donnée est différente selon le solvant considéré. Marty et coll, 1992<sup>[188]</sup>, en étudiant l’activité de synthèse d’esters éthyliques d’acide oléique dans l’hexane ou le  $\text{CO}_2$  super –critique ( $\text{CO}_2\text{sc}$ ), montrent que l’activité enzymatique du Lipozyle RM est optimale avec un catalyseur hydraté à 10%, soit une  $a_w$  de 0,5. Cependant, ce niveau d’hydratation est atteint dans les deux solvants de polarité différente, avec un apport en eau plus important dans le solvant le plus polaire ( $\text{CO}_2\text{sc}$ ). Dans le but de décrire les partages de l’eau entre

support enzymatique et solvant, Condoret et coll, 1997<sup>[189]</sup> proposent l’utilisation des isothermes d’adsorption.

- Le support d’immobilisation. Reslow et coll, 1988<sup>[190]</sup> montrent l’importance du support d’immobilisation dans le contrôle de l’a<sub>w</sub>. En effet, le support est susceptible de s’hydrater et donc de capter de l’eau depuis son milieu. Le terme d’aquaphilicité a été proposé pour mesurer la capacité des supports à capter l’eau. Les auteurs estiment cette capacité au travers du rapport quantité d’eau dans le support versus quantité d’eau dans le milieu. L’hydratation des supports d’aquaphilicité importante peut entrer en compétition avec l’hydratation de la protéine et entraîner des diminutions des activités enzymatiques. A l’inverse des supports de très faible aquaphilicité peuvent provoquer l’assèchement des enzymes dont la conséquence première est de faibles taux d’activité. Il existe donc des optima d’aquaphilicité dépendants du solvant (Reslow et coll, 1988)<sup>[190]</sup>.

Plusieurs méthodes ont été développées pour permettre le contrôle de l’a<sub>w</sub> dans les réactions biochimiques. La plus simple reste, selon Halling, 1994<sup>[178]</sup>, l’équilibration de l’ensemble des réactifs (substrats et solvants) et biocatalyseurs, dans des enceintes hermétiques, en présence de solutions saturées de sels dont l’activité est fixe et connue (Table I.5-4).

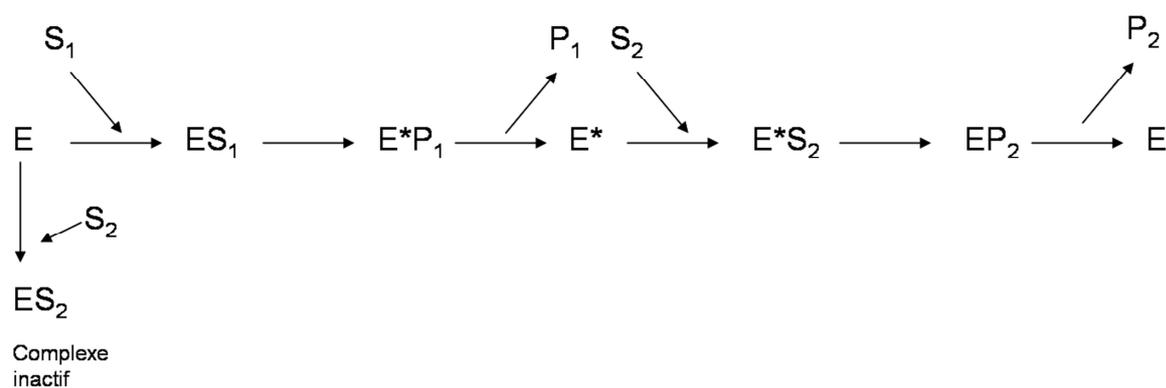
**Table I.5-4 : Activité de l’eau de solutions de sels saturées à 25°C<sup>[191]</sup>.**

Sel saturé	a <sub>w</sub>	Sel saturé	a <sub>w</sub>
LiCl	0,113	KI	0,689
Acétate K	0,225	NaCl	0,753
MgCl <sub>2</sub>	0,328	KCl	0,843
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,432	KNO <sub>3</sub>	0,936
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,529	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,973
NaBr	0,576		

## I.6 Synthèse d’esters à partir d’huiles végétales par les lipases

### I.6.1 Mécanisme réactionnel.

Le mécanisme réactionnel le plus communément accepté pour les lipases est le modèle de Ping Pong Bi Bi avec inhibition compétitive de la part du co-substrat, que ce soit pour les réactions d’estérification<sup>[192-194]</sup>, de transestérification<sup>[195-197]</sup> ou d’interestérification<sup>[177]</sup>. Le principe est exposé dans la Figure I.6-1 suivante.



**Figure I.6-1:** Schéma du mécanisme réactionnel de type Ping-Pong Bi-Bi chez les lipases. *E* : Enzyme ; *E\** : Enzyme dans son état transitoire ; *S*<sub>1</sub> : Substrat 1 (acide ou ester); *S*<sub>2</sub> : Substrat 2 (eau ou alcool); *P*<sub>1</sub> : Produit 1 (eau ou alcool); *P*<sub>2</sub> : Produit 2 (acide ou ester).

Le premier substrat de réaction *S*<sub>1</sub> (acide ou ester) se lie à l’enzyme (*ES*<sub>1</sub>) pour former un complexe actif (*E\*P*<sub>1</sub>) qui va permettre la libération du premier produit de réaction *P*<sub>1</sub> (eau ou alcool). L’enzyme sous sa forme transitoire *E\** va fixer le second substrat réactionnel (*E\*S*<sub>2</sub>) (eau ou alcool) pour permettre la libération du second produit de réaction *P*<sub>2</sub> (acide ou ester) et régénérer l’enzyme. Une voie parallèle compétitive coexiste : la fixation d’une molécule co substrat *S*<sub>2</sub> avant fixation du substrat *S*<sub>1</sub> conduit à la formation d’un complexe inactif (inhibition compétitive).

L’équation cinétique d’un tel système est donnée dans l’équation I-26 suivante établie par Segel, 1975<sup>[198]</sup>.

$$V_i = \frac{V_{\max} [S_1][S_2]}{K_{MS_1}[S_2] \left(1 + \frac{[S_2]}{K_I}\right) + K_{MS_2}[S_1] + [S_1][S_2]} \quad (\text{Eq. I-26})$$

avec :

$V_{\max}$  : vitesse de réaction maximale de l’enzyme.

$K_{MS_1}$  : Constante d’affinité du substrat 1.

$K_{MS_2}$  : Constante d’affinité du substrat 2.

$K_I$  : Constante d’inhibition du substrat 2.

$[S_1]$  : Concentration en substrat 1.

$[S_2]$  : Concentration en substrat 2.

Certains auteurs proposent un modèle Ping Pong Bi Bi alternatif dans lequel les deux substrats sont inhibiteurs<sup>[199-201]</sup>. Cela introduit un nouveau terme dans l’équation cinétique 26 qui tient compte de l’inhibition des deux substrats (Equation I-27).

$$V_i = \frac{V_{\max} [S_1][S_2]}{[S_1][S_2] + K_{MS_1}[S_2] \left(1 + \frac{[S_2]}{K_{IS_2}}\right) + K_{MS_2}[S_1] \left(1 + \frac{[S_1]}{K_{IS_1}}\right)} \quad (\text{Eq. I-27})$$

avec :

$K_{MS_1}$  : Constante d’affinité du substrat 1

$K_{MS_2}$  : Constante d’affinité du substrat 2

$K_{IS_1}$  : Constante d’inhibition du substrat 1

---

$K_{IS2}$  : Constante d’inhibition du substrat 2

$[S_1]$  : Concentration en substrat 1

$[S_2]$  : Concentration en substrat 2

Certains auteurs postulent que l’eau présente dans le milieu réactionnel initial a un effet sur la cinétique enzymatique. Par exemple, Janssen et coll, 1999<sup>[202]</sup> proposent d’établir une équation cinétique à 5 paramètres pour permettre de prendre en compte l’activité initiale de l’eau, qui par ailleurs est l’un des deux produits de la réaction d’estérification. Bousquet-Dubouch et coll. 2001<sup>[185]</sup> identifient l’eau présente dans le milieu (contrôlée au travers de son activité  $a_w$ ) comme un inhibiteur compétitif de la lipase lors de la réaction d’alcoololyse du propionate méthyle par le *n*-propanol.

Van Tol et coll, 1995<sup>[203]</sup>, proposent d’utiliser les activités thermodynamiques des composés intervenant dans une réaction enzymatique, en lieu et place des concentrations dans les équations cinétiques. Cette approche permet de tenir compte de la disponibilité des substrats et des produits, en fonction du solvant utilisé. En effet, cette disponibilité constitue une partie des paramètres cinétiques de l’enzyme et leur contribution va varier selon les solvants. De façon théorique, la prise en compte des activités thermodynamiques des substrats, au lieu des concentrations, dans les équations cinétiques permet de transformer les paramètres intrinsèques (constante d’affinité et vitesse maximale) en des paramètres égaux dans tous les milieux. Van Tol et coll, 1995<sup>[203]</sup> déterminent néanmoins que seuls les paramètres d’affinité sont affectés par les corrections apportées.

Sandoval et coll, 2001<sup>[194]</sup> utilisent ce principe pour définir le modèle TABEK (Thermodynamic Activity Based Enzyme Kinetics) présenté comme un outil rationnel pour le choix optimal des solvants impliqués dans les réactions. Les auteurs obtiennent une bonne

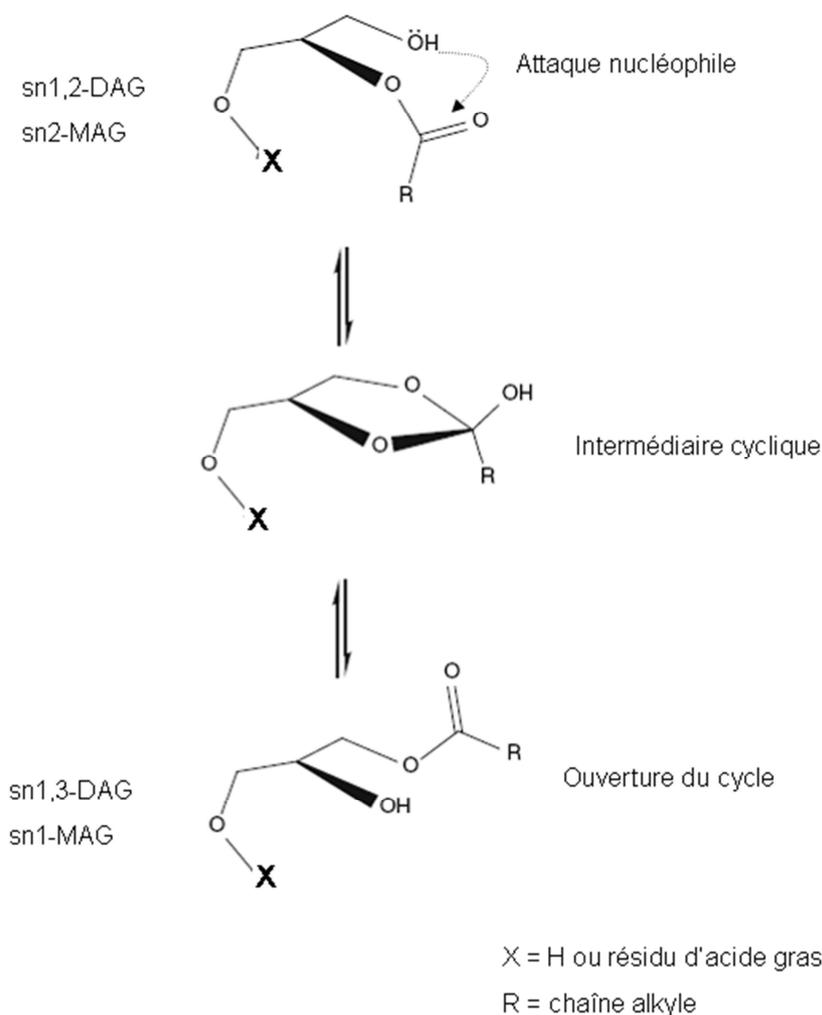
corrélation en ce qui concerne les paramètres d’affinité (constantes d’affinité et constante d’inhibition) d’une réaction de type Ping-Pong Bi-Bi avec inhibition compétitive de l’alcool co-substrat. En revanche, le paramètre de vitesse maximale est dépendant du solvant. Les auteurs n’ont pas pu dégager de corrélation complète entre ce dernier paramètre et les propriétés physico-chimiques des solvants utilisés.

### **I.6.2 Migration d’acyle.**

Au cours de la réaction d’alcoololyse enzymatique d’huiles végétales avec un alcool en présence d’une lipase strictement *sn1,3*-spécifique, un rendement théorique maximal en ester est supposé être de 66%. Cependant, de nombreux auteurs, tels que Du et coll. 2005<sup>[204]</sup>, ont observé des rendements bien supérieurs, de l’ordre de 90%. Ces observations démontrent l’occurrence d’un phénomène dit de migration d’acyle en cours de réaction, conduisant à l’isomérisation de :

- *sn2*-MAG en *sn1(3)*-MAG, forme thermodynamiquement stable des MAG.
- *sn1, 2*-DAG en *sn1, 3*-DAG, forme thermodynamiquement stable des DAG.

Le processus fut proposé la première fois par Fischer et coll en 1920 et est illustré dans la Figure I.6-2. Il met en jeu la formation d’un intermédiaire cyclique à 5 carbones initié par l’attaque nucléophile de l’oxygène de l’hydroxyle primaire sur le groupement carbonyle de l’acyle secondaire. L’ouverture du cycle entraîne la formation de l’isomère de MAG ou DAG thermodynamiquement stable. A l’équilibre, des ratios de 9 *sn1 (3)*-MAG pour 1 *sn2*-MAG et de 2 *sn1, 3*-DAG pour 1 *sn1, 2*-DAG sont ainsi naturellement atteints. Ces équilibres sont influencés par la longueur de chaîne des acides gras et les solvants<sup>[205-207]</sup>.



**Figure I.6-2 : Processus d'isomérisation (migration d'acycle) des MAG ou DAG avec formation d'un intermédiaire cyclique à 5 atomes.**

Les facteurs pouvant influencer le processus naturel de migration d'acycle sont nombreux. Premièrement, la réaction d'isomérisation est grandement influencée par la température (selon la loi d'Arrhenius<sup>[208]</sup>). En dehors de tout autre paramètre pouvant catalyser la réaction, Compton et coll., 2007<sup>[205]</sup> et Laszlo et coll., 2008<sup>[207]</sup>, évaluent le taux de migration d'acycle respectivement des *sn2*-MAG et des *sn1, 2* DAG en fonction de la température. Ils observent

des réactions du premier ordre (de même que Boswinkel et coll., 1996<sup>[209]</sup>) dont les cinétiques sont présentées dans la Figure I.6-3.

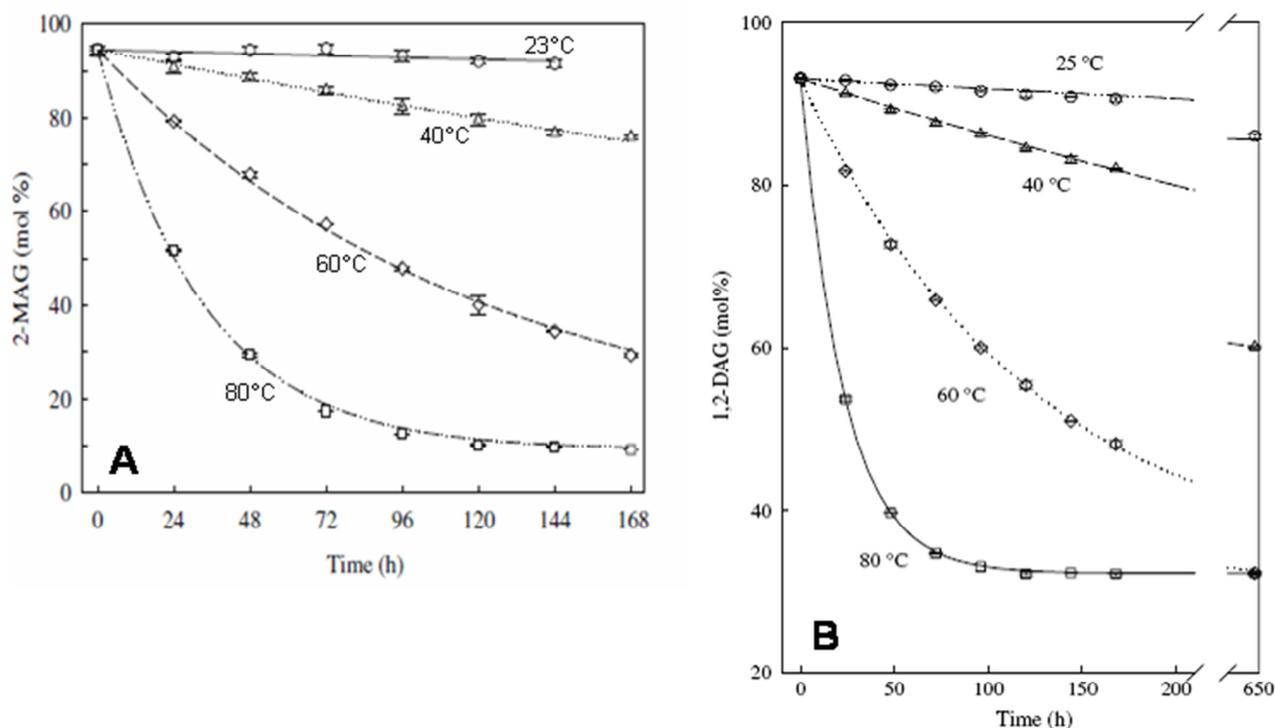


Figure I.6-3: Influence de la température lors de l'isomérisation naturelle des *sn2*-MAG en *sn1(3)* MAG (figure A) et des *sn1, 2*-DAG en *sn1, 3*-DAG (figure B)<sup>[205, 207]</sup>. Les températures respectives sont indiquées sur les figures.

La détermination des paramètres cinétiques et notamment les temps de demi vie révèlent des taux d'isomérisation similaires pour les *sn2*-MAG et les *sn1, 2* DAG (Table I.6-1). Si la migration d'acyle est relativement discrète à faible température ( $t_{1/2}$  de l'ordre de 3 500 heures à 25°C), elle est largement augmentée lorsque la température s'accroît ( $t_{1/2}$  diminué d'un facteur 175 à 80°C (20h environ))

Table I.6-1: Comparaison des temps de demi-vie des *sn1,2*-DAG et des *sn2*-MAG lors du processus de migration d’acyle en fonction la température<sup>[205, 207]</sup>.

Température (°C)	<i>sn1, 2</i> -DAG	<i>sn2</i> -MAG
	t <sub>1/2</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)
25°C	3425	3500
40°C	573	447
60°C	83,5	83,8
80°C	15,8	22,8

Millqvist Fureby et coll, 1996<sup>[206]</sup> référencent l’influence d’un certain nombre de paramètres sur la migration d’acyle des *sn2*-MAG :

- Effet du solvant. Les solvants aprotiques hydrophobes (n-hexane, cyclohexane, toluène, octane etc...) et les solvants protiques polaires (Méthanol, Ethanol ...) ont tendance à favoriser la migration d’acyle. Les *sn2*-MAGs sont plus stables dans les solvants dipolaires hydrophobes (acétone, 2-butanone etc..).
- Activité de l’eau. D’une façon générale, la migration d’acyle est ralentie quand des solvants saturés en eau sont utilisés plutôt que des solvants anhydres.
- Ajout d’alcool dans les solvants. L’alcool permet d’augmenter la polarité du solvant de la même manière que l’eau et engendre une réduction du taux de migration d’acyle de l’ordre de 50%. L’effet de l’alcool (C2 à C6) est mineur.
- Concentration en *sn2*-MAG. Plus la concentration en *sn2*-MAG est importante, plus la polarité augmente, ce qui tend à réduire la migration d’acyle. Les MAG peuvent également interagir entre eux, ce qui les stabiliserait.
- Les acides et les bases sont catalyseurs de la réaction d’isomérisation. L’augmentation de la vitesse de migration d’acyle dépend de la force du catalyseur.

- 
- Présence d’additifs solides. Les supports enzymatiques peuvent avoir une influence sur la migration d’acyle. Tous les supports portant des charges ioniques ou ayant une surface polaire entraînent une augmentation du taux de migration d’acyle. Dans ce cadre, les supports traditionnels tels que la Célite (support de la lipase PS Amano IM), la Duolite A568 (support du Lipozyme RM IM) ou la silice (support du Lipozyme TL IM) sont des accélérateurs de la migration d’acyle <sup>[204, 206]</sup>.

### **I.6.3 Alcoololyse enzymatique des huiles.**

#### **I.6.3.1 Généralités**

L’alcoololyse des huiles pour la production d’esters est certainement, et de loin, la stratégie la plus utilisée. Une image de la pluralité des travaux sur ce sujet est présentée dans les tables Table I.6-2, page 166).

Les corps gras les plus utilisés sont les huiles de soja, de tournesol, de colza, de palme et de coton. D’autres sources d’huiles ont néanmoins été explorées pour la production d’esters : huile de carthame, de ricin ou de jatropha et même des graisses animales (ard, suif ou encore graisse de canard). Il est intéressant de constater que la transformation d’huiles déchets (graisses de restaurant, huiles acides, huiles alimentaires déchets etc...) dont la composition est souvent mal maîtrisée et dans lesquelles des taux importants d’acides gras libres peuvent empêcher une bonne catalyse chimique (formation de savon en présence de soude) est possible directement par catalyse enzymatique.

La lipase la plus utilisée est de loin la lipase B de *Candida antarctica*, commercialement immobilisée sur Lewatit VPOC 1600 sous le nom de Novozyme 435. Les lipases de *Thermomyces lanuginosa*, de *Rhizomucor miehei* et de *Burkholderia cepacia*, respectivement

---

immobilisées sur granule de silice, sur Duolite et sur cœur de diatomées sont également grandement employées. D’autres enzymes telles que la lipase de *Pseudomonas fluorescens* ou de *Candida cylindracea (rugosa)* ont démontré leur capacité à catalyser la réaction. Certains auteurs proposent d’associer plusieurs lipases dans une même réaction, afin de profiter de leurs spécificités respectives<sup>[210-214]</sup>.

Du fait de son faible coût de production et de son grand niveau de pureté, le méthanol est de loin l’alcool le plus utilisé. L’éthanol est également grandement utilisé. La possibilité de procéder à la réaction de transestérification en présence d’alcools primaires de plus hauts poids moléculaires (propanol ou butanol), d’alcools secondaires (2-Propanol, 2-Butanol) voire d’alcools branchés (2-méthylbutanol, 3-méthylbutanol) a été démontrée<sup>[215]</sup>. Ceci ouvre la possibilité d’utiliser les huiles de fusel comme alcool de transestérification<sup>[216]</sup>. Ces co-produits de l’industrie de l’éthanol sont des mélanges d’alcools linéaires et ramifiés contenant de 2 à 5 carbones.

Le comportement réactionnel des lipases vis à vis des alcools peut être extrêmement différent d’une lipase à l’autre (effet de la typo-spécificité des lipases)<sup>[217]</sup>. D’une façon générale, les alcools secondaires sont moins efficacement acceptés par les lipases que les alcools primaires<sup>[215]</sup>. Seule la lipase B de *Candida antarctica* permet d’obtenir des rendements supérieurs avec ces alcools

Table I.6-2: Production d’esters d’acides gras par catalyse enzymatique à partir de différentes matières premières, alcools et type de réacteur. Nd : non déterminé.

Huile (source)	Alcool	Lipase (origine)	Ratio Accepteur d'acyle : Huile	Temp. (°C)	Solvant	Rendement (%)	Réutilisation	Stabilité	Références
Arachide	Méthanol	<i>P. fluorescens</i>	3	40°C	Sans Solvant	73 ( c )	nd	nd	[218]
Canola	Méthanol	<i>T. lanuginosa</i>	6	50°C	Sans Solvant	97 ( c )	10 cycles	Aucune perte	[219]
	Méthanol	<i>T. lanuginosa</i>	6	40°C	Sans Solvant	80	11 cycles	-10%	[220]
Carthame	Méthanol	<i>P. fluorescens</i>	3	50°C	1,4-Dioxane	~70 ( c )	nd	nd	[221]
	Butanol	<i>P. fluorescens</i>	3	50°C	Sans Solvant	~95 ( c )	nd	nd	[221]
Coprah	Alcools I <sup>aire</sup> et II <sup>aire</sup>	<i>P. cepacia</i>	4	40°C	Sans Solvant	40 ( c ) (Butanol)	nd	nd	[222]
	Méthanol	<i>P. fluorescens</i>	3	40°C	Sans Solvant	82 ( c )	nd	nd	[218]
Colza	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	40°C	<i>tert</i> -Butanol	76,1 ( c )	nd	nd	[223]
	Méthanol	<i>T. lanuginosa</i>	2	35°C	<i>tert</i> -butanol	33,5 ( t )	>100 cycles	Pertes négligeables	[224]
	Méthanol	<i>T. lanuginosa</i>	2	35°C	<i>n</i> -hexane	37,5 ( t )	~10 cycles	-43%	[224]
Colza	Méthanol	<i>T. lanuginosa</i>	2	35°C	Ether de pétrole	37,4 ( t )	~10 cycles	-65%	[224]
	Méthanol	<i>T. lanuginosa</i> + <i>C. antarctica</i> B	4	35°C	<i>tert</i> -Butanol	95 ( r )	200cycles	- de 10%	[212]
Colza brut	Méthanol	<i>C. sp 99-125</i>	3	40°C	Ether de pétrole	81 ( r )	nd	nd	[225]
Coton	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	4	50°C	Sans Solvant	91,5 ( t )	nd	nd	[215]
	Propanol	<i>C. antarctica</i> B	4	50°C	Sans Solvant	~86 ( t )	nd	nd	[215]
	Butanol	<i>C. antarctica</i> B	4	50°C	Sans Solvant	~80 ( t )	nd	nd	[215]
	2-Propanol	<i>C. antarctica</i> B	4	50°C	Sans Solvant	72,3 ( t )	nd	nd	[215]
	2-MethylButanol	<i>C. antarctica</i> B	4	50°C	Sans Solvant	~82 ( t )	nd	nd	[215]
	3-MethylButanol	<i>C. antarctica</i> B	4	50°C	Sans Solvant	~93 ( t )	nd	nd	[215]
	Méthanol	<i>R. miehei</i>	3	40°C	Sans Solvant	83 ( c )	8 cycles	30% de perte	[218]
Coton vierge	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	6	50°C	<i>tert</i> -Butanol	97 ( r )	nd	nd	[226]

**Table I.6-2: Production d’esters d’acides gras par catalyse enzymatique à partir de différentes matières premières, alcools et type de réacteur. (Suite) Nd : non déterminé.**

Huile (source)	Alcool	Lipase (origine)	Ratio Accepteur d'acyle : Huile	Temp. (°C)	Solvant	Rendement (%)	Réutilisation	Stabilité	Réf
Coton vierge	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	6	50°C	<i>tert</i> -Butanol	95 ( r )	500 h	Aucune perte	[226]
Distillat de désodorisation de soja	Méthanol	<i>T. lanuginosa</i> + <i>C. antarctica</i> B	3,6	40°C	<i>tert</i> -Butanol	97 ( r )	120cycles	Aucune perte	[214]
graisse de canard	huile de fusel	<i>C. antarctica</i> B + <i>T lanuginosa</i>	4	45°C	Sans Solvant	90	nd	nd	[219]
	huile de fusel	<i>C. antarctica</i> B + <i>T lanuginosa</i>	4	45°C	<i>tert</i> -Butanol	70	nd	nd	[213]
Graisse de restaurant	Ethanol	<i>P. cepacia</i>	4	40°C	Sans Solvant	95 ( c )	nd	nd	[228]
	Méthanol	<i>P. cepacia</i>	4	40°C	Sans Solvant	98 ( c )	nd	nd	[228]
	Ethanol	<i>P. cepacia</i>	6,6	38,4	Sans Solvant	85,4 ( r )	nd	nd	[229]
	Ethanol	<i>P. cepacia</i> + <i>C. antarctica</i>	6,6	45°C	Sans Solvant	> 96 ( r )	nd	nd	[229]
	Ethanol	<i>P. cepacia</i>	4	50°C	Sans Solvant	94 ( t )	6cycles	Pas de perte significative	[230]
		<i>B. cepacia</i>	4	50°C	Sans Solvant	>96 ( r )	nd	nd	[230]
Huile acide (résidu raffinage)	Méthanol	<i>A oryzae</i> et <i>A. niger</i>	2,4	28,11°C	Sans Solvant	88,7 ( r )	nd	nd	[210]
Huile alimentaire déchet	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	30°C	Sans Solvant	90,8 ( c )	100j	Aucune perte	[232]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	30°C	Sans Solvant	90,2 ( c )	100j	Aucune perte	[232]
huile végétale non spécifiée	Méthanol	<i>C. sp 99-125</i>	3	40°C	Ether de pétrole	96	8cycles	20% de perte (à 15% H <sub>2</sub> O)	[233]
	Méthanol	<i>C. sp 99-125</i>	3	40°C	<i>n</i> -hexane	96 ( r )	nd	nd	[234]
	Méthanol	<i>C. sp 99-126</i>	3	40°C	Ether de pétrole	93 ( r )	nd	nd	[234]
	Méthanol	<i>C. sp 99-127</i>	3	40°C	Benzene	63 ( r )	nd	nd	[234]
	Méthanol	<i>C. sp 99-128</i>	3	40°C	Acétone	40 ( r )	nd	nd	[234]
	Méthanol	<i>C. sp 99-129</i>	1	40°C	Ether de pétrole	35 ( r )	10jours	~30% de perte	[234]
Jatropha	Méthanol	<i>R. oryzae</i> cellule entière	3	30°C	Sans Solvant	80 ( t )	5 cycles	10% de perte	[235]

**Table I.6-2: Production d’esters d’acides gras par catalyse enzymatique à partir de différentes matières premières, alcools et type de réacteur. (Suite) Nd : non déterminé.**

Huile (source)	Alcool	Lipase (origine)	Ratio Accepteur d'acyle : Huile	Temp. (°C)	Solvant	Rendement (%)	Réutilisation	Stabilité	Réf
Jatropha	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	30°C	Sans Solvant	76 ( t )	5 cycles	6% de perte	[235]
	Méthanol	<i>E. aerogenes</i>	4	55°C	<i>tert</i> -Butanol	94 ( r )	20 cycles	40% de perte	[236]
Lard fractionné	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	30°C	Sans solvant	74 ( c )	nd	nd	[211]
Noix de palme	alcools I <sup>aire</sup> et II <sup>aire</sup>	<i>P. cepacia</i>	4	40°C	Sans Solvant	72 ( c ) (Ethanol)	nd	nd	[222]
	Méthanol	<i>P. fluorescens</i>	3	40°C	Sans Solvant	74 ( c )	nd	nd	[218]
Palme	Ethanol	<i>T. lanuginosa</i>	3	50°C	Sans Solvant	25 ( r )	nd	nd	[237]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	4	40°C	<i>tert</i> -Butanol	88 ( r )	nd	nd	[238]
Palme brut	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	6	40°C	<i>tert</i> -Butanol	91-92 ( r )	5 cycles	Aucune perte	[239]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	40°C	Sans Solvant	91-92 ( r )	5 cycles	29% de perte	[239]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	40°C	LiCl saturé	91-92 ( r )	5 cycles	32% de perte	[239]
	Ethanol	<i>T. lanuginosa</i>	3	50°C	Sans Solvant	25 ( t )	nd	nd	[237]
Palme oléique	Méthanol	<i>T. lanuginosa</i>	3	40°C	<i>n</i> -hexane	97 ( c )	nd	nd	[218]
	Méthanol	<i>P. fluorescens</i>	3	40°C	Sans Solvant	82 ( c )	nd	nd	[218]
Ricin	Ethanol	<i>C. antarctica</i> B	10	65°C	<i>n</i> -hexane	81,4 ( c )	nd	nd	[240]
	Ethanol	<i>R. miehei</i>	3	65°C	<i>n</i> -hexane	98 ( c )	nd	nd	[240]
Soja	Méthanol	<i>R. miehei</i>	2,37	50°C	<i>n</i> -hexane	76,9 ( t )	nd	nd	[241]
	Méthanol	<i>R. miehei</i>	3,4	36,5°C	<i>n</i> -hexane	92,2 ( c )	nd	nd	[242]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	4,5	25°C	Sans Solvant	97 ( c )	9 cycles	-15%	[243]

**Table I.6-2: Production d’esters d’acides gras par catalyse enzymatique à partir de différentes matières premières, alcools et type de réacteur. (Suite).** Nd : non déterminé.

Huile (source)	Alcool	Lipase (origine)	Ratio Accepteur d’acyle : Huile	Temp. (°C)	Solvant	Rendement (%)	Réutilisation	Stabilité	Ref
Soja	Méthanol	<i>T. lanuginosa</i>	3	25°C	Sans Solvant	84 ( c )	9 cycles	Perte totale	[243]
	Méthanol	<i>R. oryzae</i> + <i>C. rugosa</i>	4,5	45°C	Sans Solvant	99 ( c )	10 cycles	-20%	[211]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	30°C	Sans Solvant	70 ( c )	70jours	Pertes faibles	[244]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	30°C	Sans Solvant	97 ( c )	20 cycles	Aucune perte	[245]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	5	30-35°C	Sans Solvant	~44 ( r )	7 cycles	10% de perte	[217]
	Ethanol	<i>T. lanuginosa</i>	7	30-35°C	Sans Solvant	~53,5 ( r )	7 cycles	20% de perte	[217]
	Butanol	<i>R. miehei</i>	9	30-35°C	Sans Solvant	~53,5 ( r )	7 cycles	25% de perte	[217]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	40°C	2-Méthyl-2-Butanol	97 ( c )	150 cycles	Aucune perte	[246]
Soja + Colza	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	30°C	Sans Solvant	> 96,1 ( c )	nd	nd	[247]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	30°C	Sans Solvant	96,1 ( c )	70 cycles	Aucune perte	[247]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	30°C	Sans Solvant	93 ( c )	100j	Aucune perte	[247]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	30°C	Sans Solvant	98,4 ( c )	50 cycles	5% de perte	[248]
Soja + Soja hydrogéné	Méthanol	<i>T. lanuginosa</i>	4	40°C	Sans Solvant	92 ( r )	10 cycles	5% de perte	[249]
Soja brut	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	30°C	Sans Solvant	93,8 ( c )	8 cycles	Perte totale	[250]
Soja dégommé	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	30°C	Sans Solvant	95,9 ( c )	25 cycles	Aucune perte	[250]
Suif	Ethanol	<i>P. cepacia</i>	4	50°C	Sans Solvant	91 ( t )	nd	nd	[228]
Terres décolorantes activées déchets	Butanol	<i>C. cylindracea</i>	3	37°C	<i>n</i> -hexane	96 ( t )	nd	nd	[57]
	Méthanol	<i>C. cylindracea</i>	4	37°C	kérosène	~100 ( r )	nd	nd	[251]
Tournesol	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	1	40°C	Sans Solvant	29,7 ( c )	5 cycles	Gain de 20%	[252]
	Ethanol	Pancréatique porcine	3	45°C	Sans Solvant	81 ( t )	4	-90%	[253]

**Table I.6-2: Production d’esters d’acides gras par catalyse enzymatique à partir de différentes matières premières, alcools et type de réacteur. (Suite).** Nd : non déterminé.

Huile (source)	Alcool	Lipase (origine)	Ratio Accepteur d'acyle : Huile	Temp. (°C)	Solvant	Rendement (%)	Réutilisation	Stabilité	Ref
Tournesol	Ethanol	<i>M. miehei</i>	3	50°C	Sans Solvant	83 ( r )	4	Perte totale	[254]
	Méthanol	<i>C. antarctica</i> B	3	45°C	Sans Solvant	>99 ( c )	5 cycles	Perte totale	[255]
	2-Propanol	<i>C. antarctica</i> B	3	45°C	Sans Solvant	96,85 ( c )	5 cycles	90% de perte	[255]
	Butanol	<i>C. antarctica</i> B	3	45°C	Sans Solvant	89,31 ( c )	5 cycles	90% de perte	[255]
	Méthyl acétate	<i>C. antarctica</i> B	12	45°C	Sans Solvant	99,83 ( c )	8 cycles	36% de perte	[255]
	Méthyl acétate	<i>C. antarctica</i> B	12	45°C	Sans Solvant	96,25 ( c )	8 cycles	1% de perte	[255]
	Méthanol	<i>P. fluorescens</i>	3	40°C	Sans solvant	>95	nd	nd	[256]
	Méthanol	<i>R. miehei</i>	3	40°C	Sans solvant	>80	8 cycles	15% de perte	[256]
	Méthanol	<i>T. lanuginosa</i>	3	40°C	Sans solvant	>60	8 cycles	70% de perte	[256]
	Méthanol	<i>R. miehei</i>	3	40°C	Sans Solvant	84 ( c )	nd	nd	[218]
	2-Propanol	<i>C. antarctica</i> B	3	70°C	Sans Solvant	84 ( r )	nd	nd	[59]
Tournesol Oléique	Butanol	<i>R. miehei</i>	4	40°C	Sans Solvant		90jours	Aucune perte	[56]
	Butanol	<i>R. miehei</i>	4	40°C	n-hexane	95 ( c )	14h	Perte totale	[257]
	Butanol	<i>R. miehei</i>	4	40°C	n-hexane	80 ( c )	48h	Activité maintenue	[257]
Trioléine	Alcools I <sup>aire</sup> , II <sup>aire</sup> et branchés	<i>P. cepacia</i>	3	40°C	Sans Solvant	100 ( c )	nd	nd	[216]
	Huile de fusel	<i>P. cepacia</i>	4	40°C	Sans Solvant	100 ( c )	nd	nd	[216]

### I.6.3.2 Solvant et activité enzymatique.

La mise en œuvre de réaction sans solvant est souvent préconisée dans un contexte de production industrielle. En effet, ces systèmes présentent entre autres avantages celui de permettre une réduction des coûts (downstream, recyclage etc...), une réduction des risques liés à la manipulation des solvants ou encore une diminution des risques écologiques... Néanmoins, dans certains cas, leur utilisation est de premier intérêt au cours de réactions mettant en jeu des substrats et produits pouvant être très différents (triglycérides vs alcool, esters vs glycérol par exemple). Un choix judicieux du solvant apparaît souvent comme un compromis judicieux entre équilibre réactionnel, activité et stabilité enzymatiques.

Laane et coll, 1987<sup>[258]</sup>, en compilant les données de plus de 150 travaux, définissent les gammes de polarité de solvant optimales pour la catalyse enzymatique. Trois classes se dégagent en fonction du Log(P) des solvants :

- Les solvants organiques hydrophobes dont le Log(P) est supérieur à 4, considérés comme les plus adaptés pour la biocatalyse.
- Les solvants de polarité moyenne ( $2 < \text{Log(P)} < 4$ ) dans lesquels la biocatalyse est modérément efficace
- Les solvants polaires ( $\text{Log(P)} < 2$ ), dans lesquels les vitesses de biocatalyse sont faibles.

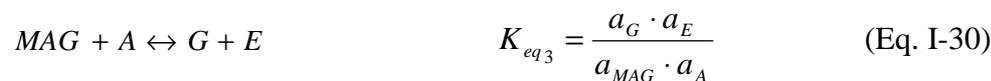
Ces observations constituent les ‘‘règles de Laane’’.

Les solvants employés lors de la réaction enzymatique peuvent être directement inhibiteurs de la réaction. En effet, Graber et coll, 2007<sup>[259]</sup> comparent l’effet de la présence d’alcools tertiaires, de cétones et d’alcane sur la réaction de transestérification entre le propanoate de méthyle et le propanol, dans un réacteur solide-gaz à  $a_w$  contrôlée. Il apparaît clairement que les cétones et les alcools tertiaires agissent comme des inhibiteurs de la réaction, là où aucun

phénomène d’inhibition n’est observé avec les alcanes. Cet effet d’inhibition pourrait faire partie du processus par lequel les enzymes présentent de faibles activités dans les solvants polaires.

### I.6.3.3 Influence du milieu sur la position d’équilibre réactionnel.

La position de l’état d’équilibre chimique de chacune des trois réactions successives de transestérification des triglycérides en esters est décrite par sa propre constante d’équilibre  $K_{eq1}$ ,  $K_{eq2}$ ,  $K_{eq3}$  respectivement à une température donnée.



où  $a_i$  représente l’activité thermodynamique des TAG, DAG, MAG, A (alcool), G (glycérol) et E (esters). L’activité de chaque composant est exprimée comme le produit de sa fraction molaire ( $x_i$ ) et du coefficient d’activité ( $\gamma_i$ ) et les équations I-28 à I-30 peuvent être écrites sous la forme des équations I-31 à I-33.

L’augmentation ou la diminution de l’activité de l’un des constituants du mélange aboutira à une adaptation des autres activités de façon à rétablir l’équilibre et maintenir  $K_{eqi}$  constante. Egalement, réduire l’activité d’un co-produit (glycérol par exemple) ou augmenter l’activité d’un co-substrat (alcool par exemple) va induire une augmentation de l’activité du produit d’intérêt et par voie de conséquence, une augmentation de sa fraction molaire à l’équilibre.

$$K_{eq1} = \frac{x_{DAG} \cdot x_E}{x_{TAG} \cdot x_A} \times \frac{\gamma_{DAG} \cdot \gamma_E}{\gamma_{TAG} \cdot \gamma_A} \quad (\text{Eq. I-31})$$

$$K_{eq2} = \frac{x_{MAG} \cdot x_E}{x_{DAG} \cdot x_A} \times \frac{\gamma_{MAG} \cdot \gamma_E}{\gamma_{DAG} \cdot \gamma_A} \quad (\text{Eq. I-32})$$

$$K_{eq3} = \frac{x_G \cdot x_E}{x_{MAG} \cdot x_A} \times \frac{\gamma_G \cdot \gamma_E}{\gamma_{MAG} \cdot \gamma_A} \quad (\text{Eq. I-33})$$

Les équations 31 à 33 montrent que l’ajout d’un solvant va agir sur la constante d’équilibre. Premièrement, l’addition d’un solvant va affecter les activités des composés à l’équilibre, en diminuant leur concentration (ce qui n’est pas forcément un effet souhaitable). Par ailleurs, le solvant va faire varier les coefficients d’activité  $\gamma_i$  des composés impliqués dans la réaction. Ces changements peuvent être à la fois positifs ou négatifs, le tout dépendant de la nature du solvant.

Janssen et coll, 1993<sup>[260]</sup> étudient l’effet du solvant de réaction sur l’équilibre réactionnel de synthèse de glycérides à partir de glycérol et d’acide décanoïque par la lipase de *Chromobacterium viscosum*. Leurs résultats montrent clairement que le profil des produits dépend du solvant employé. En effet pour des solvants de faible Log(P) (solvants polaires), les produits polaires, tels que les monoglycérides, sont mieux solvatés. Les produits apolaires tels que les triglycérides sont, eux, mieux solvatés par les solvants non-polaires de haute valeur de Log(P). Cela aboutit à de hautes fractions molaires de monoesters et à de faibles fractions molaires de triesters dans les solvants polaires (Log(P)<1). L’addition de solvants de polarité décroissante permet l’augmentation des fractions molaires de triesters et la diminution de celles des monoesters.

Ces travaux rejoignent les observations de Bellot et coll., 2001<sup>[261]</sup> qui arrivent à contrôler la production de monooléine, de dioléine ou de trioléine à partir de glycérol et d’acide oléique

---

en utilisant des mélanges de solvants polaires (le 2-méthyl-2-butanol) et de solvants apolaires (le *n*-hexane). Les auteurs en concluent que le produit de réaction qui a le plus d’affinité avec le solvant, ou système de solvants, utilisé est favorisé. De même, Castillo et coll, 2003<sup>[262]</sup> obtiennent des degrés différents d’estérification du xylitol par l’acide oléique, selon la nature du solvant utilisé. En effet, ils observent 94% mol de di- et triesters contre 6% de monoesters dans le *n*-hexane pur, alors que 73% de monoesters sont synthétisés dans un mélange de 2-méthyl-2-butanol/diméthylsulfoxyde 80/20.

Dans le cadre de la réaction de transesterification des huiles, Kamini et Iefuji, 2001<sup>[263]</sup>, établissent que l’addition de solvants organiques permet d’augmenter la teneur finale en esters méthyliques de 80,2% (milieu sans solvant) à 85% (diméthylsulfoxyde), 86,1% (*n*-hexane) et 87,2% (Ether de Pétrole) alors que le diéthyl-éther conduit à une teneur de 70,4% seulement. De même, Soumanou et Bornscheuer, 2003<sup>[256]</sup> étudient l’effet des solvants sur la réaction de méthanolyse de l’huile de tournesol : cyclohexane, *n*-heptane, isooctane, acétone et éther de pétrole. A l’exception de l’acétone, tous les solvants donnent de hauts rendements avec trois enzymes immobilisées (Lipases de *Rhizopus miehei*, *Thermomyces lanuginosa* et *Pseudomonas fluorescens*). En comparaison, l’utilisation d’acétone aboutit à une faible conversion de 5 à 20% selon l’enzyme. Ils attribuent cela à la capacité de ce solvant polaire d’altérer la conformation native des enzymes, en perturbant les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes, conduisant ainsi à de faible taux d’activité. Cela rejoint les observations de Deng et coll, 2003<sup>[225]</sup> ou de Nie et coll, 2006<sup>[234]</sup> qui déterminent que le degré d’estérification est diminué en même temps que le Log(P) du solvant employé (Figure I.6-4).

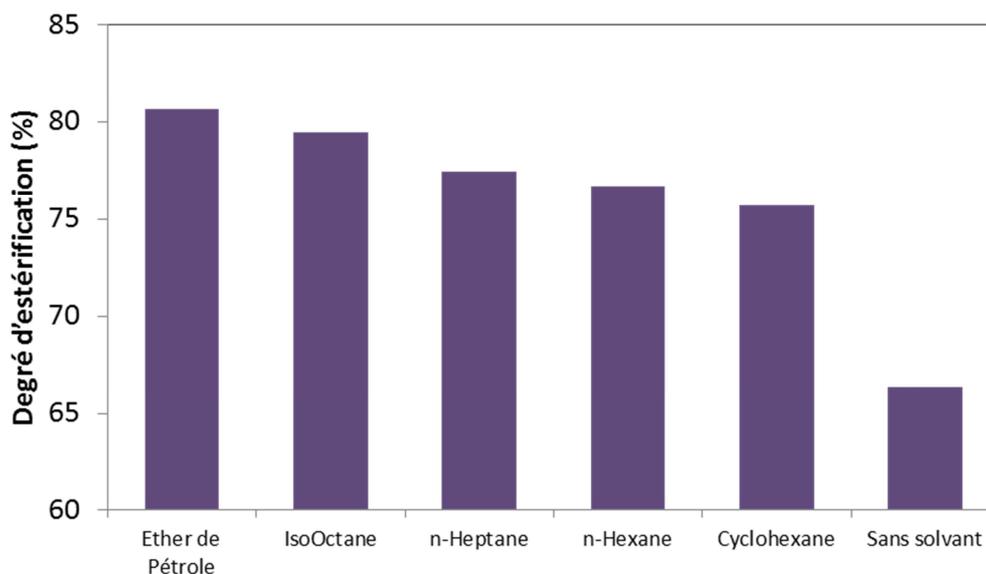


Figure I.6-4 : Effet des solvants organiques sur les rendements de transestérification<sup>[225]</sup>. Les solvants listés en abscisses sont classés selon leur Log(P).

#### I.6.3.4 Gestion des composés polaires

La gestion des composés polaires est un challenge important dans les réactions de transestérification. Colombié et coll., 1998<sup>[182]</sup> montrent que la stabilité d'un réacteur continu est assurée, si et seulement si le milieu réactionnel est capable d'évacuer l'eau produite lors de la réaction d'estérification d'acide oléique par l'éthanol. Dans le cas contraire, l'eau produite s'accumule dans le réacteur du fait de son adsorption sur le support enzymatique, donnant lieu à des pertes de stabilité. Des phénomènes similaires sont rencontrés dans les réactions de transestérification où les composés polaires sont multiples :

- l'alcool co-substrat de réaction (spécialement quand son nombre de carbone est inférieur à 3)
- Le glycérol co-produit final de la réaction et molécule hautement polaire.
- D'autres composés polaires pouvant être présents dans les huiles végétales, notamment les phospholipides des huiles brutes.

#### I.6.3.4.1 Gestion des alcools de petite taille (nombre de carbone inférieur à 3)

La balance stœchiométrique de la transestérification de triglycérides impose un minimum de 3 équivalents molaires pour obtenir une réaction totale. Shimada et coll, 1999<sup>[248]</sup> effectuent la transestérification d’un mélange d’huile de soja et d’huile de colza avec du méthanol, catalysée par le Novozyme 435 à 30°C. Au-delà d’un ratio molaire entre méthanol et triglycérides de 1,5, l’activité de méthanolyse décroît rapidement jusqu’à une inactivité totale (Figure I.6-5). Cette inactivation du catalyseur paraît même irréversible, des tentatives de restauration d’activité par transfert de l’enzyme dans des milieux frais contenant moins de 1,5 équivalent de méthanol, restant infructueuses.

Les auteurs attribuent cet effet dénaturant du méthanol au fait qu’au-delà du ratio méthanol/triglycérides, le méthanol se disperse dans l’huile sous forme de gouttelettes entraînant l’inactivation de la lipase. Cette observation a été confirmée par plusieurs auteurs<sup>[215, 221, 228, 232, 247]</sup>.

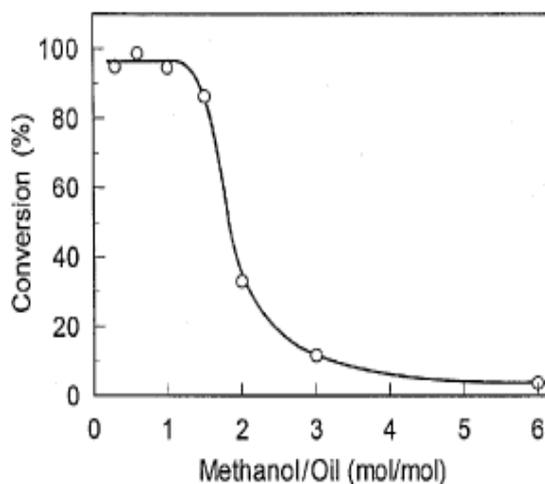


Figure I.6-5 : Taux de transestérification d’un mélange d’huile de soja et de colza par le méthanol catalysé par Novozyme 435 : effet inhibiteur du méthanol à ratio molaire méthanol/huile supérieur à 1,5<sup>[248]</sup>.

Dans une moindre mesure, le même phénomène a été observé avec l’éthanol qui, au-delà d’un ratio molaire de 2, est également dénaturant pour des raisons identiques au méthanol<sup>[221, 243, 264]</sup>. Ce phénomène d’inactivation paraît dépendant de l’enzyme considérée et de la nature du support d’immobilisation. En effet, Hernandez Martin et Otero, 2008<sup>[243]</sup> montrent que le phénomène de dénaturation, par le méthanol ou l’éthanol, est plus marqué pour le Lipozyme RM IM que pour le Novozyme 435.

Pour s’affranchir de cet effet dénaturant, plusieurs stratégies ont été développées :

(1) Apport séquentiel de l’alcool co-substrat.

Shimada et coll, 1999<sup>[248]</sup> proposent une réaction de méthanolyse en 3 étapes (Figure I.6-6). Chaque étape consécutive est réalisée en présence d’un unique équivalent molaire de méthanol, qui, en conséquence, ne produit pas d’effet de dénaturation. Des conversions de 96% peuvent ainsi être atteintes. Par ailleurs, cette approche réactionnelle permet de réutiliser l’enzyme immobilisée dans 50 nouvelles réactions consécutives, effectuées dans les mêmes conditions tout en conservant une activité importante.

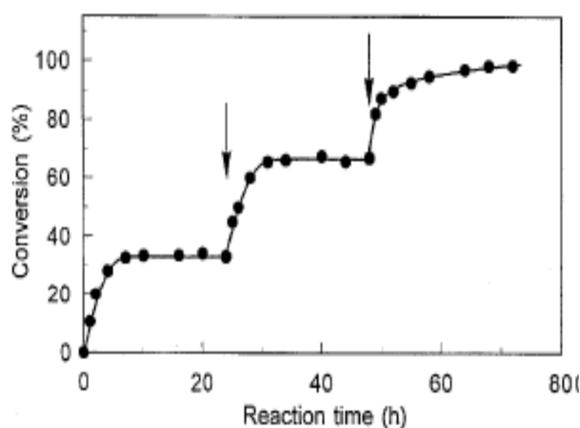


Figure I.6-6 : Cinétique de méthanolyse d’huile végétale par Novozyme 435<sup>[248]</sup>. Conditions initiales : ratio molaire méthanol/huile, 1/1 ; 1 équivalent molaire de méthanol ajouté après 24h et 48h (indiqué par les flèches).

---

Cette stratégie de réaction avec apport successif d’alcool a été largement reprise dans les travaux présentés dans la littérature<sup>[211, 218, 220, 232, 237, 239, 247]</sup>. Afin d’augmenter le rendement de conversion, certains auteurs utilisent même des ratios molaires alcool /triglycérides plus importants (de l’ordre de 4 ou 5), tout en augmentant le nombre d’ajouts de fractions d’alcool au cours de la réaction : 9 apports pour Samukawa et coll, 2000<sup>[245]</sup> et 10 apports pour Lee et coll., 2002<sup>[211]</sup>. Ils obtiennent ainsi des conversions de 97% et de 99% respectivement.

D’autre part, il a été montré que l’inhibition due aux alcools de faible nombre de carbones peut être contournée en élevant la température de réaction (pour induire une meilleure solubilisation de l’alcool et/ou en augmentant les quantités d’enzymes). C’est ainsi que Hernandez et Otero, 2008<sup>[243]</sup> arrivent à obtenir 97% de conversion en esters à 50°C avec 50% (m/m d’huile) de Novozyme 435 avec un apport unique de méthanol à un ratio molaire de 3.

### (2) Adsorption de l’alcool sur support polaire.

Un autre moyen de résoudre les problèmes liés à la miscibilité partielle des alcools est d’utiliser un support hydrophile. Lee et coll., 2002<sup>[211]</sup> effectuent un apport de silice dans le milieu réactionnel pour palier les effets néfastes du méthanol. Celui-ci permet l’adsorption du méthanol et agit comme un réservoir à méthanol protégeant la lipase d’une exposition à de trop fortes quantités de méthanol.

### (3) Solvants polaires

L’utilisation d’un solvant polaire peut se révéler être une bonne stratégie pour solubiliser à la fois triglycérides et alcools. Iso et coll., 2001<sup>[221]</sup> démontrent que l’utilisation de 1,4-Dioxane est nécessaire pour effectuer la méthanolyse ou l’éthanololyse de l’huile de Carthame par la lipase de *Pseudomonas fluorescens* immobilisée.

---

Au contraire, les alcools contenant plus de 2 carbones sont complètement miscibles aux huiles. L’effet dénaturant montré avec le méthanol et l’éthanol n’est pas rencontré. La majorité des travaux utilisant des alcools de plus de 2 carbones se fait donc avec un apport initial unique. Dans ces cas là, l’utilisation de solvants n’est pas une nécessité<sup>[59, 196, 221-222, 215-217]</sup>.

#### I.6.3.4.2 Gestion du glycérol produit.

D’une manière générale, si les solvants apolaires (hexane, éther de pétrole etc ...) permettent l’obtention de conversions élevées (voir section I.6.3.3), leur utilisation s’accompagne souvent de faible stabilité opérationnelle de la lipase. Par exemple, Du et coll, 2007<sup>[224]</sup> observent près de 40% et 65% de chute d’activité lorsque la lipase de *Thermomyces lanuginosa* est recyclée 10 fois, dans des réactions contenant du *n*-hexane et de l’éther de pétrole respectivement. Nie et coll 2006<sup>[234]</sup>, obtiennent une chute de 30% de l’activité de la lipase après 10jours de réaction en présence d’éther de pétrole.

Cette instabilité catalytique est particulièrement bien illustrée par les travaux de Dossat et coll, 1999<sup>[257]</sup> qui étudient la transestérification de l’huile de tournesol oléique par le butanol, en présence de *n*-hexane en réacteur continu de Lipozyme RM IM. Les auteurs obtiennent une décroissance très rapide de l’activité de la lipase jusqu’à une inactivation quasi totale. L’agent responsable de cette instabilité a été identifié comme étant le glycérol, produit de la réaction, adsorbé sur le support enzymatique. Dossat et coll, 1999<sup>[257]</sup> supposent que ce glycérol crée une barrière hydrophile autour de la lipase entraînant des limitations dans le transfert des substrats hydrophobes (triglycérides) vers l’enzyme. Les auteurs remarquent d’ailleurs que ce glycérol peut être désorbé par lavage du catalyseur avec un solvant susceptible de le solubiliser: eau, solvant polaire tel que le 2-méthyl-2-butanol. L’activité de la lipase est ainsi en grande partie restaurée.

---

Chen et Wu, 2003<sup>[244]</sup> utilisent le *tert*-butanol pour restaurer 75% de l’activité initiale de Novozyme 435, après inactivation par le glycérol. Dizge et coll, 2008<sup>[220]</sup> arrivent à maintenir une activité stable de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* immobilisée au cours de 11 réactions successives grâce à un traitement post-réactionnel au *tert*-butanol.

#### I.6.3.4.3 Solubilisation des substrats polaires.

De plus en plus, Les solvants de polarité moyenne (*tert*-butanol ou le 2-méthyl-2-butanol) s’imposent comme des solvants incontournables dans la synthèse d’esters d’acides gras à partir d’huiles végétales. Ces solvants sont susceptibles de solubiliser à la fois triglycérides, alcools co-substrats et glycérol formé en cours de réaction. L’utilisation de ces solvants permet ainsi :

- d’éliminer l’effet d’inactivation causé par les alcools à miscibilité partielle dans les huiles à ratios molaires élevés (voir section I.6.3.4.1) Il est ainsi possible d’augmenter les ratios molaires entre alcool et triglycérides, pour améliorer les rendements sans observer d’effets néfastes.
- de limiter l’adsorption du glycérol sur les supports enzymatiques, permettant ainsi le maintien de l’activité enzymatique tout en conservant des rendements de réactions acceptables<sup>[226]</sup>.

En utilisant le *tert*-butanol comme solvant, Li et coll, 2006<sup>[212]</sup> ne dénombrent que 10% de baisse d’activité après 200 réactions de transestérification de l’huile de colza catalysée par un mélange de lipases de *Thermomyces lanuginosa* (3%) et de *Candida antarctica* (1%) avec un rendement de 95%. Royon et coll., 2007<sup>[226]</sup> utilisent le *tert*-butanol pour catalyser la transestérification continue de l’huile de coton par le Novozyme 435 avec un ratio molaire méthanol/huile de 6. La réaction est maintenue pendant 500 heures sans observer de perte

---

d’activité significative. Wang et coll., 2006<sup>[214]</sup> mettent en oeuvre un mélange de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* (3%) et de *Candida antarctica* (2%) dans un milieu contenant du *tert*-butanol pour catalyser la transestérification des résidus du raffinage de l’huile de soja avec un ratio méthanol/huile de 3,6. Le mélange enzymatique est stable avec un rendement de ~97% pendant 150 réactions consécutives sans perte notable d’activité. Zheng et coll, 2009<sup>[246]</sup> utilisent le 2-méthyl-2-butanol dans la même optique et obtiennent une grande stabilité pendant plus de 150 réactions consécutives.

#### **I.6.4 Alcoololyse enzymatique des huiles vierges.**

Le coût de la production d’esters d’acides gras est intimement lié au cours de la matière première. Afin d’en réduire l’incidence, l’utilisation de sources d’huiles n’ayant pas subi de processus de raffinage a été testée. La principale différence entre huile brute et huile raffinée est la présence de molécules mineures non éliminées par le processus de raffinage. Il s’agit notamment de phospholipides, d’acides gras libres et d’eau (voir section I.2.2)

La capacité des lipases à catalyser la réaction de transestérification d’huiles vierges a été démontrée : Novozyme 435<sup>[239, 250, 265]</sup>, Lipozyme TL IM et Lipozyme RM IM<sup>[237]</sup>, lipase de *Rhizopus oryzae*<sup>[266]</sup>.

Watanabe et coll, 2002<sup>[250]</sup> comparent ainsi l’efficacité de transestérification par le méthanol de trois formes d’huile de soja dans un milieu sans solvant : brute, dégommée et raffinée. Si un haut degré de conversion et une activité équivalente de Novozyme 435 sont observées lorsque l’huile est dégommée ou raffinée, une conversion trois fois inférieure est obtenue avec une huile de soja brute. Par ailleurs, la transformation de cette forme d’huile s’accompagne d’une instabilité de l’enzyme dans des réactions répétées. Les auteurs identifient cette baisse d’activité et cette instabilité comme étant dues à la présence de phospholipides dans l’huile de soja brute, capables de s’adsorber sur le catalyseur. Effectivement, ils déterminent que dès

---

une concentration de 0,2% de phospholipides dans l’huile, l’activité de la lipase est affectée et peut même être totalement perdue à des concentrations supérieures. Néanmoins, l’effet d’inactivation semble être lié à la forme des phospholipides, ces derniers ayant des pouvoirs inhibiteurs différents selon leur source.

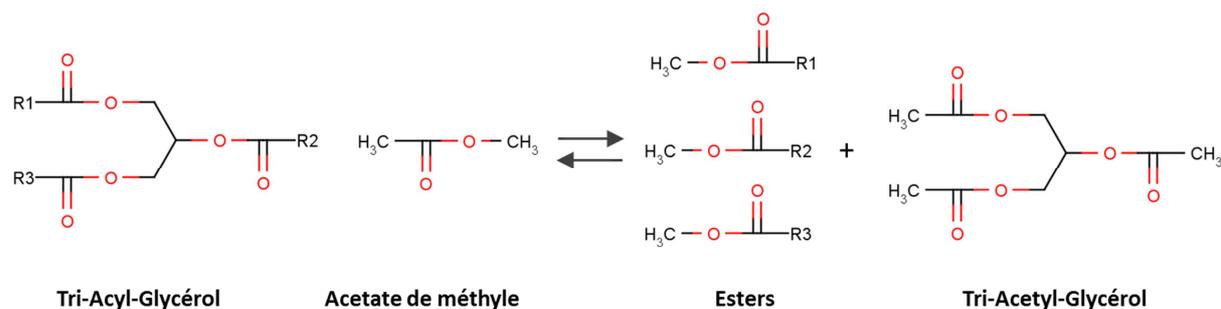
L’effet inhibiteur des phospholipides des huiles vierges est également constaté par Talukder et coll., 2009<sup>[239]</sup> et par Du et coll., 2004<sup>[265]</sup> lors de la méthanolyse, respectivement, d’huile de palme brute et d’huile de soja brute par Novozyme 435. Ils obtiennent des taux d’activité moindres avec des huiles brutes par rapport à des huiles raffinées. A l’inverse, Li et coll., 2007<sup>[266]</sup> observent une augmentation de l’activité de la lipase de *Rhizopus oryzae*, utilisée en cellule entière et une absence de perte de stabilité du catalyseur comme l’ont pu observer Watanabe et coll., 2002<sup>[250]</sup>. Ils en attribuent la cause à une activité phospholipasique de la lipase.

Talukder et coll., 2009<sup>[239]</sup> déterminent par ailleurs que les carotènes potentiellement présents dans les huiles brutes ne sont pas susceptibles d’entraîner d’effets néfastes sur la réaction de transestérification. Du et coll., 2004<sup>[265]</sup> estiment que la teneur élevée en acides gras libres dans les huiles vierges n’a pas d’incidence sur la réaction de transestérification.

## **I.6.5 Autres stratégies de production enzymatique d’esters d’acides gras à partir des huiles.**

### **I.6.5.1 Interestérification des huiles avec des esters d’alkyle.**

Afin de s’affranchir des problématiques de dénaturation des lipases par les alcools à faible miscibilité et de limiter les phénomènes d’adsorption de glycérol entraînant de faibles stabilités enzymatiques, l’utilisation d’esters d’alkyle en tant qu’accepteurs d’acyle a été proposée (Figure I.6-7)<sup>[255, 267-272]</sup>.



**Figure I.6-7: Interestérisation entre triglycérides et acétate de méthyle pour la production d’esters méthyliques d’acides gras**

En effet, il a été prouvé que les acétates d’alkyle (acétate de méthyle, acétate d’éthyle etc...) présentent une miscibilité complète avec les triglycérides des huiles, et ne sont donc pas susceptibles d’être à l’origine d’effets néfastes pour les lipases. Ils sont donc utilisables sans apport extérieur de solvant. Par ailleurs, l’interestérisation des triglycérides avec des acétates d’alkyle, produit du tri-acétyl-glycérol, en lieu et place du glycérol dans la réaction d’alcoololyse. Cette forme tri-acétylée du glycérol n’est pas à même de s’adsorber sur les supports enzymatiques en raison de sa polarité fortement diminuée en comparaison avec sa forme libre. Cela permet donc d’assurer la pérennité du catalyseur. Par ailleurs, cela représente une forme de valorisation du glycérol produit qui trouve ainsi des applications dans l’industrie alimentaire, l’industrie du tabac ou encore dans l’industrie des carburants<sup>[270]</sup>.

Xu et coll., 2003<sup>[272]</sup> effectuent ainsi l’interestérisation d’huile de soja avec l’acétate de méthyle catalysée par le Novozyme 435. Ils obtiennent une conversion de 92% en 10h à 40°C pour un ratio molaire optimal acétate de méthyle/triglycérides de 12. Les auteurs n’observent pas de perte d’activité de la lipase après une série de 10 réactions successives. Du et coll., 2004<sup>[265]</sup> utilisent les mêmes conditions que les auteurs précédents et n’obtiennent pas de perte significative d’activité après 100 cycles réactionnels. A des ratios élevés (au delà de 16),

---

une baisse des rendements peut être attribuée à une dilution excessive de l’huile dans le milieu.

Modi et coll., 2006<sup>[270]</sup> utilisent l’acétate d’éthyle à un ratio molaire de 11 pour interestérifier les huiles brutes de jatropha, karanja et tournesol. Dans les conditions optimales, ils obtiennent des rendements en esters éthyliques de 91.3%, 90% et 92.7%. L’activité de la lipase est parfaitement maintenue au cours de 12 réactions successives, là où l’activité est totalement perdue au bout de 6 réactions avec de l’éthanol.

Ognajovic et coll., 2009<sup>[255]</sup> effectuent la comparaison entre les réactions d’interestérification avec l’acétate de méthyle et de transestérification avec le méthanol catalysé par Novozyme 435. L’étude de la stabilité des lipases montre que l’utilisation de l’acétate de méthyle permet une augmentation du temps de demi-vie de la lipase d’un facteur 20 par rapport au méthanol sans solvant.

#### I.6.5.2 Interestérification des huiles avec des carbonates d’alkyle.

La production d’esters méthyliques ou éthyliques par transestérification de triglycérides avec des diméthyl ou diéthyl carbonates a été décrite récemment<sup>[27341, 274]</sup>. L’avantage de la réaction est qu’elle est irréversible car le co-produit (le mono-méthyl ou mono-éthyl ester de l’acide carbonique) est capable de se décomposer immédiatement en alcool méthylique ou éthylique et en CO<sub>2</sub> (Figure I.6-8). Cela permet ainsi de déplacer les équilibres réactionnels et d’optimiser les rendements de transestérification.

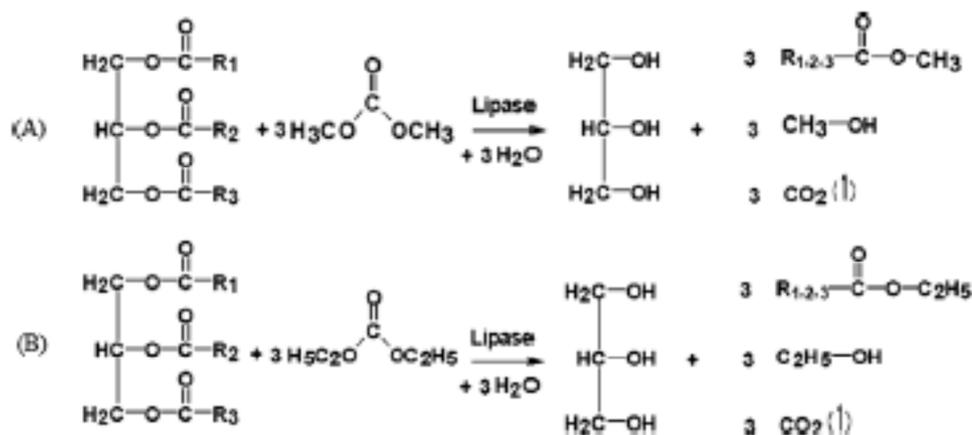


Figure I.6-8: Transestérification de triglycérides par les dialkyl carbonate. (A) diméthyl-carbonate. (B) diéthyl-carbonate.

Su et coll., 2007<sup>[274]</sup>, déterminent que le Novozyme 435 permet de catalyser efficacement la réaction de transestérification avec un rendement approchant les 96% pour un ratio molaire de 4,5. Cependant, les auteurs observent une faible stabilité de l’enzyme au cours de réactions répétées consécutivement. En effet, la lipase perd la quasi-totalité de son activité après 5 cycles. Cette inactivation peut être limitée à une diminution de 20% seulement en cas de lavage de l’enzyme par l’acétone, l’inactivation étant certainement liée à des phénomènes d’adsorption de glycérol (voir section I.6.3.4).

Klaas et Warwel, 2001<sup>[275]</sup> et Su et coll., 2009<sup>[273]</sup> proposent de lier extraction par solvant et transestérification, par les dialkyl-carbonates en une seule et même étape. Les deux travaux aboutissent à des taux d’extraction similaires aux méthodes classiques d’extraction et des taux d’estérification supérieurs également.

---

**I.6.6 Procédés continus de production d’esters d’acides gras à partir d’huile.**

La synthèse d’esters d’acides gras par voie enzymatique s’adresse en grande partie à des domaines dont la valeur ajoutée est faible. Le prix souvent prohibitif des lipases (commerciales ou non commerciales) est donc un frein au développement industriel des procédés mettant en jeu ces enzymes. Cela implique donc une optimisation de l’utilisation des lipases et donc leur utilisation dans une optique continue dans le but de réduire l’impact de leur coût sur le produit final. La Table I.6-2 (page 166) montre que la grande partie des travaux présentés dans la littérature évoque des réactions de type discontinu. Des travaux mettant en œuvre des lipases dans des systèmes de transestérification continue d’huiles sont relativement peu représentés.

Cependant de grands niveaux de stabilité des lipases dans les réactions de transestérification sont démontrés, dans des répétitions consécutives de réaction avec recyclage de l’enzyme <sup>[212, 224, 246-248, 250]</sup>. Cette stabilité démontre la compatibilité des lipases avec une utilisation continue.

Rao et coll., 2009<sup>[276]</sup> rappellent le principe des deux réacteurs types utilisés en tant que bioréacteurs enzymatiques (Figure I.6-9) :

- Le Réacteur Continu Agité (RCA) :: dans un RCA, la concentration est identique dans chaque élément de volume, en fonction du temps, si un mélange idéal est supposé. Le RCA travaille dans les conditions de sortie, à savoir faibles concentrations en substrats et hautes concentrations en produits donnant lieu à des vitesses réactionnelles faibles. A l’équilibre, la conversion est contrôlée par la quantité de catalyseur et le temps de résidence.
- Le Réacteur à Lit Fixe (Plug Flow ou Packed bed reactor) : le RLF est un réacteur à écoulement piston, constitué d’une colonne thermostatée ou non, dans laquelle est

confinée une enzyme immobilisée. Les concentrations en substrats et en produits varient tout au long du réacteur (en fonction de leur transformation), permettant des vitesses réactionnelles plus élevées. Le ratio enzyme/susbrat est maintenu élevé et les volumes de réacteurs sont en général faibles.

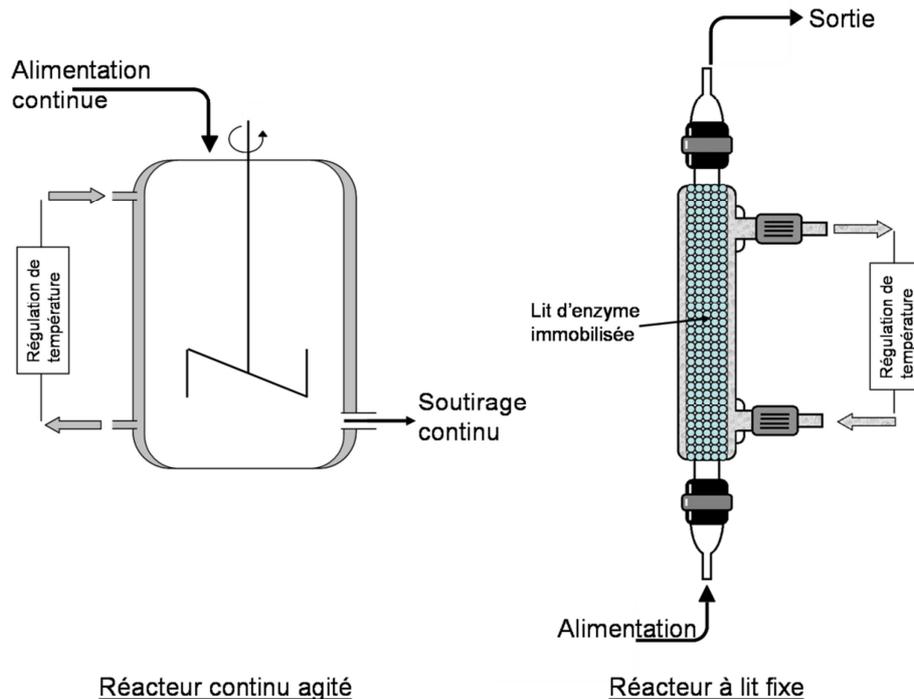


Figure I.6-9 : Schéma du Réacteur Continu Agité et du Réacteur à Lit Fixe.

Chen et Wu, 2003<sup>[244]</sup> testent l’activité de la lipase B de *Candida antarctica* dans un réacteur continu agité de méthanolyse d’huile de soja sans solvant (Volume 5L, 250g de lipase immobilisée). Le réacteur est alimenté par un mélange d’huile et de méthanol dans un rapport molaire de 3, à un débit de 20ml/min. Les auteurs observent des chutes d’activité dans le temps qui sont corrigées lorsque le taux de conversion diminue en deçà de 70%, par lavage du catalyseur avec du *tert*-butanol. Une activité constante donnant lieu à une conversion supérieure à 70% est ainsi maintenue pendant plus de 70 jours.

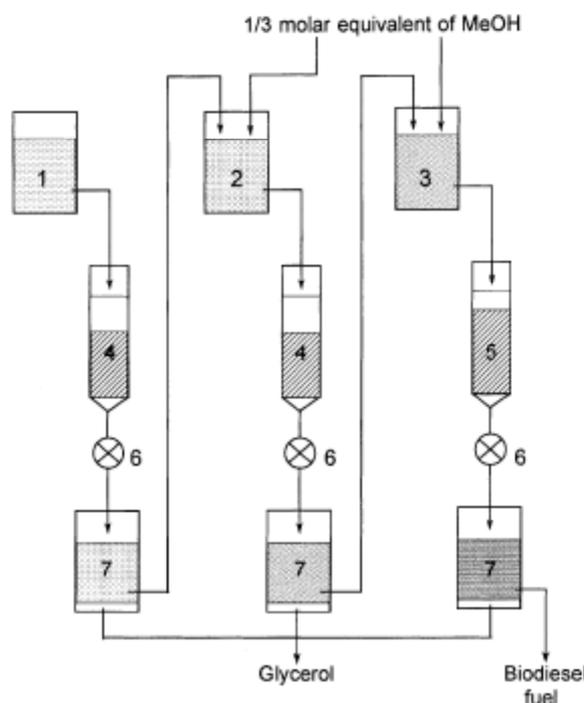
---

Dossat et coll, 1999<sup>[257]</sup> effectuent la transestérification continue de l’huile de tournesol oléique avec le butanol dans le *n*-hexane à l’aide d’un réacteur à lit fixe unique de Lipozyme RM IM. Les auteurs observent une chute très rapide des capacités de catalyse du réacteur due à l’adsorption du glycérol produit sur le biocatalyseur. Afin de restaurer l’activité, un procédé semi-continu mettant en jeu une phase de transformation et une phase de rinçage avec un solvant polaire, permettant la desorption du glycérol du biocatalyseur, a été proposé. Le réacteur a ainsi été alimenté par intermittence grâce à une électrovanne, avec un mélange huile/butanol.hexane pendant 2h et avec du 2-méthyl-2-butanol pendant 30 minutes. Une conversion de 80% est ainsi maintenue pendant 48h. L’intérêt connexe du système est d’obtenir deux mélanges séparés, l’un contenant les esters produits et l’autre le glycérol formé.

Shimada et coll., 2002<sup>[277]</sup> présentent un procédé continu de méthanolyse d’huile déchet. Ce dernier prend en compte à la fois les effets néfastes du méthanol substrat et ceux du glycérol produit. En effet, ils proposent de mettre en œuvre trois RLF en série (Figure I.6-10) contenant chacun 3g, 3g et 4,5g de Novozyme 435. Un mélange d’huile et de 1/3 équivalent de méthanol alimente le premier réacteur.

L’éluat est réceptionné dans un bac de décantation permettant de retirer le glycérol formé au sein du premier réacteur. La phase huile exempte de glycérol est additionnée de 1/3 équivalent de méthanol et alimente le second réacteur. Le troisième réacteur est alimenté de la même manière avec l’éluat du second réacteur. Un débit de 6ml/h est appliqué au système. Les auteurs ont testé les capacités du procédé à 30°C pendant 100 jours sans perte d’activité de la lipase. Ils obtiennent ainsi un mélange contenant près de 90% d’esters méthyliques. Ce procédé a été repris pour la transestérification d’huile de soja et de colza par le Novozyme 435 par Watanabe et coll, 2000. Les auteurs ont tenté de réduire la série de RLF à 2 unités,

avec un apport de 2/3 équivalents de méthanol dans le 2<sup>nd</sup> réacteur, mais une faible stabilité du réacteur a été observée.



**Figure I.6-10 : Procédé continu de production de biodiesel avec trois réacteurs à lit fixe en série<sup>[277]</sup>.** 1 : Bac d'alimentation du 1<sup>er</sup> réacteur (huile + 1/3 équivalent de méthanol) ; 2 : Bac d'alimentation du 2<sup>ème</sup> réacteur (phase huile de l'éluat du 1<sup>er</sup> réacteur + 1/3 équivalent de méthanol) ; 3 : Bac d'alimentation du 3<sup>ème</sup> réacteur (phase huile de l'éluat du 2<sup>nd</sup> réacteur + 1/3 équivalent de méthanol) ; 4 : Réacteur à lit fixe contenant 3g de Novozyme 435 ; 5 : Réacteur à lit fixe contenant 4,5g de Novozyme 435 ; 6 : pompe péristaltique ; 7 : bac récepteur de milieu réactionnel.

Nie et coll., 2006<sup>[234]</sup> utilisent un procédé comparable pour catalyser la transestérification d'huile de salade avec le méthanol. Chaque étape est réalisée à l'aide de trois RLF consécutif contenant chacun 500g de lipase de *Candida sp 99-125* immobilisée sur membrane de coton. En fin de chaque étape, le glycérol formé est extrait du mélange d'ester et de glycérides à l'aide d'un hydrocyclone.

Watanabe et coll., 2001<sup>[232]</sup> mettent en place un réacteur à lit fixe avec re-circulation. Un quart des produits est soutiré en sortie de réacteur et trois quarts des produits sont recyclés en

---

entrée. Le mélange d'alimentation est enrichi avec un mélange huile/méthanol préparé dans une proportion molaire équivalente. Aucun phénomène d'inhibition n'est observé du fait de la présence de méthanol dans ce mélange d'entrée contenant 67,6% d'esters méthyliques et 32,4% de triglycérides. Il est ainsi possible d'alimenter un réacteur unique de 3g de lipase pendant 100 jours sans perte significative d'activité et un taux de conversion en sortie de 90,2% à un débit de 4ml/h

Dossat et coll., 2002<sup>[56]</sup> réalisent la transestérification de l'huile de tournesol oléique avec le butanol, catalysée dans un RLF unique sans entreprendre de re-circulation par le Lipozyme RM IM, lipase *sn1,3*-spécifique. Les auteurs observent une période transitoire initiale de 6h pendant laquelle les produits majoritaires sont des esters butyliques et du glycérol. Ce dernier étant insoluble dans le milieu, il a tendance à s'adsorber sur le support enzymatique conduisant à une diminution des performances de la lipase. Peu à peu, la formation du glycérol diminue jusqu'à l'état d'équilibre, où la production de glycérol est totalement stoppée. Il est alors évacué du réacteur sous forme de glycérides. Un mélange contenant 65% mol d'esters butyliques, 26% mol de diglycérides, 6% mol de monoglycérides et 3% mol de triglycérides résiduels est produit. L'activité du réacteur a néanmoins été conservée dans ces conditions, sur une période de trois mois, sans instabilité aucune.

Royon et coll., 2007<sup>[226]</sup> mettent en œuvre les potentialités du tert-butanol en tant que solvant, dans un procédé continu de transestérification d'huile de coton par Novozyme 435. En effet, ils utilisent un réacteur à lit fixe unique, contenant un mélange de lipase et de billes de verre (1/1,5 m/m), alimenté par un mélange d'huile et de méthanol, avec un ratio molaire entre les deux composants de 6 et solubilisé par 32% de *tert*-butanol. Les auteurs observent ainsi un réacteur totalement stable pendant plus de 500h avec un taux de conversion de 95%.

## **I.7 Références Bibliographiques.**

1. **Meadows, D.H., D.L. Meadows, J. Randers, W.W. Behrens, and C.o. Rome** 1972. *The limits to growth*: Universe Books New York.
2. **UICN, P.** 'pour' UICN/PNUE/WWF. .1980. *WWF, 1980, Stratégie mondiale de la conservation. La conservation des ressources vivantes au service du développement durable.* Gland.
3. **Brundtland, G.H. and M. Khalid** 1987. *Our common future*: Oxford University Press, Oxford, GB.
4. **PARLEMENT EUROPÉEN.** *Directive 2008/98/CE relative aux déchets*; 2008.
5. **Site de France - Ecologie Industrielle.** Last access: 2009; Available at: <http://www.france-ecologieindustrielle.fr>.
6. **Site de l'United Nations Environment Programme.** Last access: 2010; Available at: <http://www.unep.org>.
7. **Site de Stenum.** Last access: 2009; Available at: <http://www.stenum.at/en/index.php?id=produkte/cp/cp-basics>.
8. **Anastas, P.T. and J.C. Warner** 1998. *Green Chemistry Theory and Practice*: Oxford University Press, New York.
9. **Tang, S.L.Y., R.L. Smith, and M. Poliakoff** 2005. *Principles of green chemistry: PRODUCTIVELY.* Green Chem. **7**(11): p. 761-762.
10. **Winterton, N.** 2001. *Twelve more green chemistry principles.* Green Chem. **3**(6): p. G73-G75.
11. **Anastas, P.T. and J.B. Zimmerman** 2003. *Design Through the 12 Principles of Green Engineering.* Environ. Sci. Technol. **37**(5): p. 94-101.
12. **Graedel, T.** 1999. *Green chemistry in an industrial ecology context.* Green Chem. **1**(5): p. 126-128.
13. **Site du Grenelle environnement.** Last access: 2009; Available at: [www.legrenelle-environnement.fr](http://www.legrenelle-environnement.fr).
14. *Proposition de règlement européen des produits chimiques: REACH, enjeux et perspectives.* 5; 2005.
15. **Site de REACH Chemical Management Associates (RCMA).** Last access: 2010; Available at: <http://www.rcma-expert.eu/45-Calendar-REACH.html>.
16. **Site de l'European Chemical Agency.** Last access: 2008; Available at: [http://echa.europa.eu/home\\_fr.asp](http://echa.europa.eu/home_fr.asp).

17. **Site francophone de la Convention Cadre des Nations-Unies sur les Changements Climatiques. (CCNUCC).** Last access: 2010; Available at: <http://unfccc.int>.
18. **Organisation internationale de normalisation (ISO) ISO 14040:2006 - Management environnemental -- Analyse du cycle de vie -- Principes et cadre;** 2006.
19. **Schmidheiny, S.** 1992. *Changing course*: MIT Press Cambridge, MA.
20. **Site de Responsible Care.** Last access: 2009; Available at: <http://www.responsiblecare.org/>.
21. **Site de l'UIC (Union des Industries Chimiques ).** Last access: 2009; Available at: <http://www.uic.fr>.
22. **Shay, E.G.** 1993. *Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities*. Biomass Bioenergy. **4**(4): p. 227-242.
23. **Site de la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** Last access: 2010; Available at: <http://faostat.fao.org/>.
24. **Dyer, J.M., S. Stymne, A.G. Green, A.S. Carlsson, and A.R.S. Usda** 2008. *High-value oils from plants*. Plant J. **54**: p. 640-655.
25. **Cert, A., W. Moreda, and M.C. Pérez-Camino** 2000. *Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils*. J. Chromatogr. A. **881**(1-2): p. 131-148.
26. **Dubois, V., S. Breton, M. Linder, J. Fanni, and M. Parmentier** 2007. *Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **109**(7): p. 710-732.
27. **Lisa, M. and M. Holcapek** 2008. *Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr. A. **1198-1199**: p. 115-130.
28. **Cyberlipid-Center-Resource site for lipid studies.** Last access: 2010; Available at: [www.cyberlipid.org](http://www.cyberlipid.org).
29. **Scrimgeour, C.M. and J.L. Harwood** 2007. *Fatty acid and lipid structure*, in *Lipid Handbook*. CRC Press: Boca Raton. p. 1.
30. **Bramley, P., I. Elmadfa, A. Kafatos, F. Kelly, Y. Manios, H. Roxborough, W. Schuch, P. Sheehy, and K.-H. Wagner** 2000. *Vitamin E*. J. Sci. Food Agric. **80**: p. 913-938.

- 
31. **Schwartz, H., V. Ollilainen, V. Piironen, and A.-M. Lampi** 2008.*Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats*. J. Food Compos. Anal. **21**(2): p. 152-161.
  32. **Verleyen, T., M. Forcades, R. Verhe, K. Dewettinck, A. Huyghebaert, and W. De Greyt** 2002.*Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils*. J. Am. Oil Chem. Soc. **79**(2): p. 117-122.
  33. **Phillips, K.M., D.M. Ruggio, J.I. Toivo, M.A. Swank, and A.H. Simpkins** 2002.*Free and Esterified Sterol Composition of Edible Oils and Fats*. J. Food Compos. Anal. **15**(2): p. 123-142.
  34. **Choe, E. and D.B. Min** 2006.*Mechanisms and factors for edible oil oxidation*. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. **5**(4): p. 169-186.
  35. **Owen, R.W., W. Mier, A. Giacosa, W.E. Hull, B. Spiegelhalder, and H. Bartsch** 2000.*Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene*. Food Chem. Toxicol. **38**(8): p. 647-659.
  36. **Mohamed, H.M.A. and I.I. Awatif** 1998.*The use of sesame oil unsaponifiable matter as a natural antioxidant*. Food Chem. **62**(3): p. 269-276.
  37. **Leung, J., T.W. Fenton, and D.R. Clandinin** 1981.*Phenolic Components of Sunflower Flour*. J. Food Sci. **46**(5): p. 1386-1388.
  38. **De Leonardis, A., V. Macciola, and A. Di Rocco** 2003.*Oxidative stabilization of cold-pressed sunflower oil using phenolic compounds of the same seeds*. J. Sci. Food Agric. **83**(6): p. 523-528.
  39. **Khallouki, F., C. Younos, R. Soulimani, T. Oster, Z. Charrouf, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, and R.W. Owen** 2003.*Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects*. Eur. J. Cancer Prev. **12**(1): p. 67.
  40. **Daun, J.K. and C.T. Thorsteinson** 1989.*Determination of chlorophyll pigments in crude and degummed canola oils by HPLC and spectrophotometry*. J. Am. Oil Chem. Soc. **66**(8): p. 1124-1128.
  41. **Ong, A.S.H. and E.S. Tee** 1992.*Natural sources of carotenoids from plants and oils*. Methods Enzymol. **213**(106): p. 142-167.

- 
42. **Johnson, L.A.** 2008. *Recovery, refining, converting, and stabilizing edible fats and oils*, in *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, C.C. Akoh and D.B. Min, Editors., CRC press. p. 181-228.
  43. **Velasco, J. and C. Dobarganes** 2002. *Oxidative stability of virgin olive oil*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **104**(9-10): p. 661-676.
  44. **Johnson, L.A.** *Recovery, refining, converting, and stabilizing edible fats and oils*, in *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, C.C. Akoh and D.B. Min, Editors., CRC press. p. 181-228.
  45. **Site de l'Institut des Corps Gras (ITERG)**. Last access: 2010; Available at: <http://www.iterg.com/Comment-fabrique-t-on-de-l-huile>.
  46. **Dumont, M.J. and S.S. Narine** 2007. *Soapstock and deodorizer distillates from North American vegetable oils: Review on their characterization, extraction and utilization*. Food Res. Int. **40**(8): p. 957-974.
  47. **Cmolík, J. and J. Pokorný** 2000. *Physical refining of edible oils*. J. Am. Oil Chem. Soc. **102**: p. 472-486.
  48. **Kim, H.J. and D.B. Min** 2008. *chemistry of lipid oxidation*, in *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, C.C. Akoh and D.B. Min, Editors., CRC press: Boca Raton, Etats-Unis.
  49. **Jung, M.Y. and D.B. Min** 1990. *Effects of  $\alpha$  -,  $\gamma$  -, and  $\delta$  -tocopherols on the oxidative stability of soybean oil*. J. Food Sci. **55**: p. 1464-1465.
  50. **Reische, D.W., D.A. Lillard, and R.R. Eitenmiller** 2008. *Antioxidants*, in *Food Lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, C.C. Akoh and D.B. Min, Editors., CRC Press: Boca Raton, Etats-Unis.
  51. **Judde, A., P. Villeneuve, A. Rossignol-Castera, and A. Le Guillou** 2003. *Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols*. J. Am. Oil Chem. Soc. **80**(12): p. 1209-1215.
  52. **Gordon, M.H. and P. Magos** 1983. *The effect of sterols on the oxidation of edible oils*. Food Chem. **10**(2): p. 141-147.
  53. **White, P.J. and L.S. Armstrong** 1986. *Effect of selected oat sterols on the deterioration of heated soybean oil*. J. Am. Oil Chem. Soc. **63**(4): p. 525-529.
  54. **Lampi, A.M., L.H. Dimberg, and A. Kamal-Eldin** 1999. *A study on the influence of fucosterol on thermal polymerisation of purified high oleic sunflower triacylglycerols*. J. Sci. Food Agric. **79**(4): p. 573-579.

- 
55. **Canakci, M. and H. Sanli** 2008.*Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **35**(5): p. 431-441.
  56. **Dossat, V., D. Combes, and A. Marty** 2002.*Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent-free process*. J. Biotechnol. **97**(2): p. 117-124.
  57. **Lara, P.V. and E.Y. Park** 2004.*Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using Candida cylindracea lipase in organic solvent system*. Enzyme. Microb. Technol. **34**(3-4): p. 270-277.
  58. **Stevenson, D.E., R.A. Stanley, and R.H. Furneaux** 1994.*Near-quantitative production of fatty acid alkyl esters by lipase-catalyzed alcoholysis of fats and oils with adsorption of glycerol by silica gel*. Enzyme. Microb. Technol. **16**(6): p. 478-484.
  59. **Bouaid, A., J. Aparicio, M. Martínez, and J. Aracil** 2007.*Synthesis of a green biosolvent: Isopropyl esters:: A statistical approach*. Enzyme. Microb. Technol. **41**(4): p. 533-538.
  60. **Medina Gonzalez, Y., P. De Caro, S. Thiebaud-Roux, and C. Lacaze-Dufaure** 2007.*Fatty Acid Methyl Esters as Biosolvents of Epoxy Resins: A Physicochemical Study*. J. Solution Chem. **36**(4): p. 437-446.
  61. **Berg, C. F.O. Licht**. présenté au *World Biofuels 2006*. Séville.2006.
  62. **Site de l'European Biodiesel Board** Last access: 2010; Available at: [www.ebb-eu.org](http://www.ebb-eu.org).
  63. **Site d'America's superior oil**. Last access: 2010; Available at: <http://www.renewablelubricants.com>.
  64. **Alcimed**. 'pour' Syngenta Seeds.2006. *High Oleic in Europe*.
  65. **Schneider, M.P.** 2006.*Plant-oil-based lubricants and hydraulic fluids*. J. Sci. Food Agric. **86**(12): p. 1769-1780.
  66. **Alcimed**. 'pour' Ademe.2002. *Marché actuel des bioproduits industriels et des biocarburants & Évolutions prévisibles à échéance 2015/2030*.
  67. **Alcimed**. 'pour' Ademe.2002. *Analyse des marchés potentiels des agro-solvants et recommandations pour l'orientation du programme Agrice*.
  68. **Knothe, G., A.C. Matheaus, and T.W. Ryan** 2003.*Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester\* 1*. Fuel. **82**(8): p. 971-975.
  69. **Knothe, G., J. Van Gerpen, and J. Krahl** 2005. *The biodiesel handbook*: AOCS press Champaign, IL.

- 
70. **Committee for Standardization Heating fuels.** *Method EN 14213 - fatty acid methyl esters (FAME)—requirements and test methods.*, ed. B. European Committee for Standardization; 2003.
  71. **Committee for Standardization Automotive fuels.** *Method EN 14214 - fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines—requirements and test methods.*, ed. B. European Committee for Standardization; 2003.
  72. **AOCS** 1993. *Official Method, Oil Stability Index (OSI)*,. Vol. Cd. 12b-92, Champaign, IL,; AOCS: .
  73. **Knothe, G.** 2007.*Some aspects of biodiesel oxidative stability.* Fuel Process. Technol. **88**(7): p. 669-677.
  74. **Knothe, G. and R.O. Dunn** 2009.*A comprehensive evaluation of the melting points of fatty acids and esters determined by differential scanning calorimetry.* J. Am. Oil Chem. Soc. **86**(9): p. 843-856.
  75. **Klopfenstein, W.E.** 1985.*Effect of molecular weights of fatty acid esters on cetane numbers as diesel fuels.* J. Am. Oil Chem. Soc. **62**(6): p. 1029-1031.
  76. **Freedman, B. and M.O. Bagby** 1990.*Predicting cetane numbers of n-alcohols and methyl esters from their physical properties.* J. Am. Oil Chem. Soc. **67**(9): p. 565-571.
  77. **Lapuerta, M., J. Rodríguez-Fernández, and E.F. de Mora** 2009.*Correlation for the estimation of the cetane number of biodiesel fuels and implications on the iodine number.* Energy Policy. **37**(11): p. 4337-4344.
  78. **Jalal, I.M., G. Zografí, A.K. Rakshit, and F.D. Gunstone** 1982.*Thermal analysis of fatty acids.* Chem. Phys. Lipids. **31**(4): p. 395-404.
  79. **Yao, L., E. Hammond, and T. Wang** 2008.*Melting points and viscosities of fatty acid esters that are potential targets for engineered oilseed.* J. Am. Oil Chem. Soc. **85**(1): p. 77-82.
  80. **Lee, I., L.A. Johnson, and E.G. Hammond** 1995.*Use of branched-chain esters to reduce the crystallization temperature of biodiesel.* J. Am. Oil Chem. Soc. **72**(10): p. 1155-1160.
  81. **Allen, C.A.W., K.C. Watts, R.G. Ackman, and M.J. Pegg** 1999.*Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition.* Fuel. **78**(11): p. 1319-1326.
  82. **Knothe, G. and K.R. Steidley** 2005.*Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components.* Fuel. **84**(9): p. 1059-1065.

- 
83. **Knothe, G. and R.O. Dunn** 2003.*Dependence of oil stability index of fatty compounds on their structure and concentration and presence of metals.* J. Am. Oil Chem. Soc. **80**(10): p. 1021-1026.
  84. **Moser, B.R.** 2009.*Comparative oxidative stability of fatty acid alkyl esters by accelerated methods.* J. Am. Oil Chem. Soc. **86**(7): p. 699-706.
  85. **Park, J.Y., D.K. Kim, J.P. Lee, S.C. Park, Y.J. Kim, and J.S. Lee** 2008.*Blending effects of biodiesels on oxidation stability and low temperature flow properties.* Bioresour. Technol. **99**(5): p. 1196-1203.
  86. **Schmid, A., J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, and B. Witholt** 2001.*Industrial biocatalysis today and tomorrow.* Nature. **409**(6817): p. 258-268.
  87. **Panke, S., M. Held, and M. Wubbolts** 2004.*Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals.* Curr. Opin. Biotechnol. **15**(4): p. 272-279.
  88. **Thum, O. and K.M. Oxenbell** 2008.*Biocatalysis-A Sustainable Method for the Production of Emollient Esters.* SOFW JOURNAL. **134**(1/2): p. 44.
  89. **Klibanov, A.M.** 2001.*Improving enzymes by using them in organic solvents.* Nature. **409**(6817): p. 241-246.
  90. **Klibanov, A.M., G.P. Samokhin, K. Martinek, and I.V. Berezin** 1977.*A new approach to preparative enzymatic synthesis.* Biotechnol. Bioeng. **19**(9): p. 1351-1361.
  91. **Tarquis, D., P. Monsan, and G. Durand** 1980.*Amino-acids esters synthesis by enzymic catalysis using an organic-solvent.* Bull. Soc. Chim. Fr. **Partie Ii-Chimie Moleculaire Organique Et Biologique**((1-2)): p. 76-79.
  92. **Zaks, A. and A.M. Klibanov** 1984.*Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C.* Science. **224**(4654): p. 1249.
  93. **Zaks, A. and A.M. Klibanov** 1985.*Enzyme-catalyzed processes in organic solvents.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **82**(10): p. 3192.
  94. **Bistline, R.G., A. Bilyk, and S.H. Fearheller** 1991.*Lipase catalyzed formation of fatty amides.* J. Am. Oil Chem. Soc. **68**(2): p. 95-98.
  95. **Cavaille-Lefebvre, D. and D. Combes** 1997.*Lipase synthesis of short-chain flavour thioesters in solvent-free medium.* Biocatal. Biotransform. **15**(4): p. 265-279.
  96. **Weber, N., E. Klein, K. Vosmann, and K.D. Mukherjee** 2004.*Mono-thioesters and di-thioesters by lipase-catalyzed reactions of  $\alpha,\omega$ -alkanedithiols with palmitic acid or its methyl ester.* Appl. Microbiol. Biotechnol. **64**(6): p. 800-805.

- 
97. **Brady, L., A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Hüge-Jensen, and L. Norskov** 1990. *A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase*. *Nature*.
  98. **Winkler, F.K., A. d'Arcy, and W. Hunziker** 1990. *Structure of human pancreatic lipase*. *Nature*.
  99. **Mancheño, J.M., M.A. Pernas, M.J. Martínez, B. Ochoa, M.L. Rúa, and J.A. Hermoso** 2003. *Structural Insights into the Lipase/esterase Behavior in the Candida rugosa Lipases Family: Crystal Structure of the Lipase 2 Isoenzyme at 1.97 Å Resolution*. *J. Mol. Biol.* **332**(5): p. 1059-1069.
  100. **Uppenberg, J., N. Oehrner, M. Norin, K. Hult, G.J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, and T.A. Jones** 1995. *Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from Candida antarctica reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols*. *Biochemistry*. **34**(51): p. 16838-16851.
  101. **Derewenda, U., L. Swenson, Y. Wei, R. Green, P.M. Kobos, R. Joerger, M.J. Haas, and Z.S. Derewenda** 1994. *Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi Humicola lanuginosa and Rhizopus delemar*. *J. Lipid Res.* **35**(3): p. 524.
  102. **Site 'Enzyme Structures Database'**. Last access: 2009; Available at: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes>.
  103. **Ollis, D.L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S.M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, and J. Schrag** 1992. *The {alpha}/{beta} hydrolase fold*. *Protein Eng., Des. Sel.* **5**(3): p. 197.
  104. **Akoh, C.C., G.C. Lee, Y.C. Liaw, T.H. Huang, and J.F. Shaw** 2004. *GDSL family of serine esterases/lipases*. *Prog. Lipid Res.* **43**(6): p. 534-552.
  105. **Brzozowski, A.M., U. Derewenda, Z.S. Derewenda, G.G. Dodson, D.M. Lawson, J.P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Hüge-Jensen, S.A. Patkar, and L. Thim** 1991. *A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex*. *Nature*.
  106. **Sarda, L. and P. Desnuelle** 1958. *Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions*. *Biochim. Biophys. Acta.* **30**(3): p. 513.
  107. **Cygler, M. and J.D. Schrag** 1997. *Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases*. *Methods Enzymol.* **284**: p. 3-27.

- 
108. **Pleiss, J., M. Fischer, M. Peiker, C. Thiele, and R.D. Schmid** 2000.*Lipase engineering database: Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships*. J. Mol. Catal. B: Enzym. **10**(5): p. 491-508.
109. **Fischer, M., Q. Thai, M. Grieb, and J. Pleiss** 2006.*DWARF - a data warehouse system for analyzing protein families*. BMC Bioinf. **7**(1): p. 495.
110. **Cygler, M., P. Grochulski, R.J. Kazlauskas, J.D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A.N. Serreqi, and A.K. Gupta** 1994.*A structural basis for the chiral preferences of lipases*. J. Am. Oil Chem. Soc. **116**(8): p. 3180-3186.
111. **Arpigny, J.L. and K.E. Jaeger** 1999.*Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties*. Biochem. J. **343**(Pt 1): p. 177.
112. **Barth, S., M. Fischer, R.D. Schmid, and J. Pleiss** 2004.*Sequence and structure of epoxide hydrolases: a systematic analysis*. Proteins. **55**(4): p. 846-855.
113. **Fischer, M. and J. Pleiss** 2003.*The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families*. Nucleic Acids Res. **31**(1): p. 319.
114. **Kang, H.Y., J.F. Kim, M.H. Kim, S.H. Park, T.K. Oh, and C.G. Hur** 2006.*MELDB: A database for microbial esterases and lipases*. FEBS Lett. **580**(11): p. 2736-2740.
115. **Site 'The Lipase Engineering Database'**. Last access: 2009; Available at: <http://www.led.uni-stuttgart.de/>.
116. **Arsan, J. and K.L. Parkin** 2000.*Selectivity of Rhizomucor miehei lipase as affected by choice of cosubstrate system in ester modification reactions in organic media*. Biotechnol. Bioeng. **69**(2): p. 222-226.
117. **Chang, Q.-L., C.-H. Lee, and K.L. Parkin** 1999.*Comparative selectivities of immobilized lipases from Pseudomonas cepacia and Candida antarctica (fraction B) for esterification reactions with glycerol and glycerol analogues in organic media*. Enzyme. Microb. Technol. **25**(3-5): p. 290-297.
118. **Fu, X. and K.L. Parkin** 2004.*Reaction selectivity of Burkholderia cepacia (PS-30) lipase as influenced by monoacylation of sn-glycerol*. J. Am. Oil Chem. Soc. **81**(1): p. 33-44.
119. **Gaskin, D.J.H., A. Romojaro, N.A. Turner, J. Jenkins, and E.N. Vulfson** 2001.*Alteration of lipase chain length specificity in the hydrolysis of esters by random mutagenesis*. Biotechnol. Bioeng. **73**(6): p. 433-441.

- 
120. **Janssen, A.E.M., A.M. Vaidya, and P.J. Halling** 1996.*Substrate specificity and kinetics of Candida rugosa lipase in organic media.* Enzyme. Microb. Technol. **18**(5): p. 340-346.
121. **Kumar, R., J. Modak, and G. Madras** 2005.*Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide.* Biochem. Eng. J. **23**(3): p. 199-202.
122. **Lee, C.H. and K.L. Parkin** 2000.*Comparative fatty acid selectivity of lipases in esterification reactions with glycerol and diol analogues in organic media.* Biotechnol. Prog. **16**(3): p. 372-377.
123. **Pleiss, J., M. Fischer, and R.D. Schmid** 1998.*Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site.* Chem. Phys. Lipids. **93**(1-2): p. 67-80.
124. **Schmitt, J., S. Brocca, R.D. Schmid, and J. Pleiss** 2002.*Blocking the tunnel: engineering of Candida rugosa lipase mutants with short chain length specificity.* Protein Eng., Des. Sel. **15**(7): p. 595.
125. **Vaysse, L., A. Ly, G. Moulin, and E. Dubreucq** 2002.*Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium.* Enzyme. Microb. Technol. **31**(5): p. 648-655.
126. **Warwel, S., R. Borgdorf, and L. Brühl** 1999.*Substrate selectivity of lipases in the esterification of oleic acid, linoleic acid, linolenic acid and their all-trans-isomers and in the transesterification of cis/trans-isomers of linoleic acid methyl ester.* Biotechnol. Lett. **21**(5): p. 431-436.
127. **Guieysse, D., G. Sandoval, L. Faure, J.-M. Nicaud, P. Monsan, and A. Marty** 2004.*New efficient lipase from Yarrowia lipolytica for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters.* Tetrahedron: Asymmetry. **15**(22): p. 3539-3543.
128. **Chaibakhsh, N., M.B.A. Rahman, and M. Basri** 2009.*Effect of alcohol chain length on the optimum conditions for lipase-catalyzed synthesis of adipate esters.* Biocatal. Biotransform. **99999**(1): p. 1-6.
129. **Janssen, A.E.M., A. Van der Padt, and K. Van't Riet** 1993.*Solvent effects on lipase-catalyzed esterification of glycerol and fatty acids.* Biotechnol. Bioeng. **42**(8): p. 953-962.
130. **Chandler, I.C.** 2001.*Determining the regioselectivity of immobilized lipases in triacylglycerol acidolysis reactions.* J. Am. Oil Chem. Soc. **78**(7): p. 737-742.
131. **Pfeffer, J., S. Richter, J. Nieveler, C.E. Hansen, R.B. Rhlid, R.D. Schmid, and M. Rusnak** 2006.*High yield expression of Lipase A from Candida antarctica in the*

- 
- methylotrophic yeast Pichia pastoris and its purification and characterisation*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **72**(5): p. 931-938.
132. **Brunel, L., V. Neugnot, L. Landucci, H. Boze, G. Moulin, F. Bigey, and E. Dubreucq** 2004.*High-level expression of Candida parapsilosis lipase/acyltransferase in Pichia pastoris*. J. Biotechnol. **111**(1): p. 41-50.
133. **Neugnot, V., G. Moulin, E. Dubreucq, and F. Bigey** 2002.*The lipase/acyltransferase from Candida parapsilosis Molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes*. FEBS J. **269**(6): p. 1734-1745.
134. **Ghazali, H.M., S. Hamidah, and Y.B. Che Man** 1995.*Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1, 3-specific lipases*. J. Am. Oil Chem. Soc. **72**(6): p. 633-639.
135. **Kristensen, J.B., X. Xu, and H. Mu** 2005.*Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: Screening of commercially available lipases*. J. Am. Oil Chem. Soc. **82**(5): p. 329-334.
136. **Scheib, H., J. Pleiss, A. Kovac, F. Paltauf, and R.D. Schmid** 1999.*Stereoselectivity of Mucorales lipases toward triacylglycerols—A simple solution to a complex problem*. Protein Sci. **8**(01): p. 215-221.
137. **Lang, D.A., M.L.M. Mannesse, G.H. De Haas, H.M. Verheij, and B.W. Dijkstra** 1998.*Structural basis of the chiral selectivity of Pseudomonas cepacia lipase*. Eur. J. Biochem. **254**(2): p. 333-340.
138. **Jaeger, K.E., B.W. Dijkstra, and M.T. Reetz** 1999.*BACTERIAL BIOCATALYSTS: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases*. Annu. Rev. Microbiol. **53**(1): p. 315-351.
139. **Pleiss, J., H. Scheib, and R.D. Schmid** 2000.*The His gap motif in microbial lipases: A determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs*. Biochimie. **82**(11): p. 1043-1052.
140. **Duan, Z.-Q., W. Du, and D.-H. Liu** 2010.*The solvent influence on the positional selectivity of Novozym 435 during 1,3-diolein synthesis by esterification*. Bioresour. Technol. **101**: p. 2568–2571.
141. **Erb, S.** 2006.*Single-enantiomer drugs poised for further market growth*. Pharm. Technol. **30**: p. S14.
142. **Zhang, H.Y., X. Wang, C.B. Ching, and J.C. Wu** 2005.*Experimental optimization of enzymic kinetic resolution of racemic flurbiprofen*. Biotechnol. Appl. Biochem. **42**(Pt 1): p. 67.

- 
143. **Muralidhar, R.V., R.R. Chirumamilla, V.N. Ramachandran, R. Marchant, and P. Nigam** 2001.*Racemic resolution of RS-baclofen using lipase from Candida cylindracea*. Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen). **66**(3a): p. 227.
144. **Bordes, F., E. Cambon, V. Dossat-Létisse, I. André, C. Croux, J.M. Nicaud, and A. Marty** 2009.*Improvement of Yarrowia lipolytica Lipase Enantioselectivity by Using Mutagenesis Targeted to the Substrate Binding Site*. ChemBioChem. **10**(10): p. 1705-1713.
145. **Guieysse, D., C. Salagnad, P. Monsan, and M. Remaud-Simeon** 2003.*Lipase-catalyzed enantioselective transesterification toward esters of 2-bromo-tolylacetic acids*. Tetrahedron: Asymmetry. **14**(3): p. 317-323.
146. **Palomo, J.M., R.L. Segura, M. Fuentes, C.C. Ortiz, J.M. Guisán, and R. Fernandez-Lafuente** 2006.*Unusual enzymatic resolution of ( )-glycidyl-butyrate for the production of (S)-glycidyl derivatives*. Enzyme. Microb. Technol. **38**(3-4): p. 429-435.
147. **Palomo, J.M., R.L. Segura, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisán, and R. Fernandez-Lafuente** 2004.*Enzymatic resolution of ( )-glycidyl butyrate in aqueous media. Strong modulation of the properties of the lipase from Rhizopus oryzae via immobilization techniques*. Tetrahedron: Asymmetry. **15**(7): p. 1157-1161.
148. **Jia, S.Y., J.H. Xu, Q.S. Li, and J.T. Yu** 2003.*Isolation of lipase producer and its performance in enantioselective hydrolysis of glycidyl butyrate*. Appl. Biochem. Biotechnol. **104**(1): p. 69-79.
149. **Othman, S.S., M. Basri, M.Z. Hussein, M.B. Abdul Rahman, R. Rahman, A.B. Salleh, and H. Jasmani** 2008.*Production of highly enantioselective (-)-menthyl butyrate using Candida rugosa lipase immobilized on epoxy-activated supports*. Food Chem. **106**(2): p. 437-443.
150. **Chojnacka, A., R. Obara, and C. Wawrzencyk** 2007.*Kinetic resolution of racemic secondary aliphatic allylic alcohols in lipase-catalyzed transesterification*. Tetrahedron: Asymmetry. **18**(1): p. 101-107.
151. **Kazlauskas, R.J., A.N.E. Weissfloch, A.T. Rappaport, and L.A. Cuccia** 1991.*A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from Pseudomonas cepacia, and lipase from Candida rugosa*. J. Org. Chem. **56**(8): p. 2656-2665.

- 
152. **Hanefeld, U., L. Gardossi, and E. Magner** 2009. *Understanding enzyme immobilisation*. Chem. Soc. Rev. **38**(2): p. 453-468.
  153. **Sheldon, R.A.** 2007. *Enzyme immobilization: the quest for optimum performance*. Adv. Synth. Catal. **349**(8-9): p. 1289-1307.
  154. **Persson, M., I. Mladenoska, E. Wehtje, and P. Adlercreutz** 2002. *Preparation of lipases for use in organic solvents*. Enzyme. Microb. Technol. **31**(6): p. 833-841.
  155. **Mateo, C., J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, and R. Fernandez-Lafuente** 2007. *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques*. Enzyme. Microb. Technol. **40**(6): p. 1451-1463.
  156. **Monsan, P. and D. Combes** 1988. *Enzyme stabilization by immobilization*. Methods Enzymol. **137**: p. 584-598.
  157. **Villeneuve, P., J.M. Muderhwa, J. Graille, and M.J. Haas** 2000. *Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches*. J. Mol. Catal. B: Enzym. **9**(4-6): p. 113-148.
  158. **Katsivela, E., F. Kleppe, S. Lang, and F. Wagner** 1995. *Ustilago maydis lipase I. Hydrolysis and ester-synthesis activities of crude enzyme preparation*. Enzyme. Microb. Technol. **17**(8): p. 739-745.
  159. **Sarney, D.B., M.J. Barnard, D.A. MacManus, and E.N. Vulfson** 1996. *Application of lipases to the regioselective synthesis of sucrose fatty acid monoesters*. J. Am. Oil Chem. Soc. **73**(11): p. 1481-1487.
  160. **Hiol, A., M.D. Jonzo, N. Rugani, D. Druet, L. Sarda, and L.C. Comeau** 2000. *Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic Rhizopus oryzae strain isolated from palm fruit*. Enzyme. Microb. Technol. **26**(5-6): p. 421-430.
  161. **Yadav, G.D. and S.R. Jadhav** 2005. *Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: transesterification in non-aqueous medium*. Microporous Mesoporous Mater. **86**(1-3): p. 215-222.
  162. **Yiu, H.H.P. and P.A. Wright** 2005. *Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic-organic hybrid*. J. Mater. Chem. **15**(35-36): p. 3690-3700.
  163. **Chang, S.F., S.W. Chang, Y.H. Yen, and C.J. Shieh** 2007. *Optimum immobilization of Candida rugosa lipase on Celite by RSM*. Appl. Clay Sci. **37**(1-2): p. 67-73.

- 
164. **Shah, S. and M.N. Gupta** 2007. *Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system*. *Process Biochem.* **42**(3): p. 409-414.
165. **Torres, P., D. Reyes-Duarte, N. Lopez-Cortes, M. Ferrer, A. Ballesteros, and F.J. Plou** 2007. *Acetylation of vitamin E by Candida antarctica lipase B immobilized on different carriers*. *Process Biochem.*
166. **Vaidya, A., G. Gera, and S. Ramakrishna** 2008. *Evaluation and optimization of immobilized lipase for esterification of fatty acid and monohydric alcohol*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**(12): p. 2987-2995.
167. **Al-Duri, B. and Y.P. Yong** 2000. *Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports*. *Biochem. Eng. J.* **4**(3): p. 207-215.
168. **Bosley, J.A. and A.D. Peilow** 1997. *Immobilization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**(2): p. 107-111.
169. **Lin, H.Y. and S.W. Tsai** 2003. *Dynamic kinetic resolution of (R, S)-naproxen 2, 2, 2-trifluoroethyl ester via lipase-catalyzed hydrolysis in micro-aqueous isooctane*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **24**: p. 111-120.
170. **Salis, A., E. Sanjust, V. Solinas, and M. Monduzzi** 2003. *Characterisation of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **24-25**: p. 75-82.
171. **Bosley, J.A. and J.C. Clayton** 1993. *Blueprint for a lipase support: Use of hydrophobic controlled-pore glasses as model systems*. *Biotechnol. Bioeng.* **43**(10): p. 934-938.
172. **Langmuir, I.** 1918. *The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **40**(9): p. 1361-1403.
173. **Akova, A. and G. Ustun** 2000. *Activity and adsorption of lipase from Nigella sativa seeds on Celite at different pH values*. *Biotechnol. Lett.* **22**(5): p. 355-359.
174. **Gitlesen, T., M. Bauer, and P. Adlercreutz** 1997. *Adsorption of lipase on polypropylene powder*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1345**(2): p. 188-196.
175. **Freundlich, H.** 1906. *Über die adsorption in lösungen*.
176. **Mei, Y., L. Millerm, W. Gao, and R.A. Gross** 2003. *Imaging the distribution and secondary structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy*. *Biomacromolecules.* **4**(1): p. 70-74.

- 
177. **Oliveira, M.V., S.F. Rebocho, A.S. Ribeiro, E.A. Macedo, and J.M. Loureiro** 2009. *Kinetic modelling of decyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalysed transesterification of vinyl acetate with decanol in supercritical carbon dioxide*. J. Supercrit. Fluids.
178. **Halling, P.J.** 1994. *Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis*. Enzyme. Microb. Technol. **16**(3): p. 178-206.
179. **Yong, Y.P. and B. Al-Duri** 1999. *Kinetic studies on immobilised lipase esterification of oleic acid and octanol*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. **65**(3): p. 239-248.
180. **Fureby, A.M., P. Adlercreutz, and B. Mattiasson** 1996. *Glyceride synthesis in a solvent-free system*. J. Am. Oil Chem. Soc. **73**(11): p. 1489-1495.
181. **Yong, Y.P. and B. Al-Duri** 1996. *Kinetic studies on immobilised lipase esterification of oleic acid and octanol*. J. Chem. Technol. Biotechnol. **65**(3): p. 239-248.
182. **Colombie, S., R.J. Tweddell, J.S. Condoret, and A. Marty** 2000. *Water activity control: a way to improve the efficiency of continuous lipase esterification*. Biotechnol. Bioeng. **60**(3): p. 362-368.
183. **Marty, A., V. Dossat, and J.S. Condoret** 1997. *Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds*. Biotechnol. Bioeng. **56**(2): p. 232-237.
184. **Wehtje, E. and P. Adlercreutz** 1997. *Water activity and substrate concentration effects on lipase activity*. Biotechnol. Bioeng. **55**(5): p. 798-806.
185. **Bousquet-Dubouch, M.-P., M. Graber, N. Sousa, S. Lamare, and M.-D. Legoy** 2001. *Alcoholysis catalyzed by Candida antarctica lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. **1550**(1): p. 90-99.
186. **Piyatheerawong, W., Y. Iwasaki, X. Xu, and T. Yamane** 2004. *Dependency of water concentration on ethanolysis of trioleoylglycerol by lipases*. J. Mol. Catal. B: Enzym. **28**(1): p. 19-24.
187. **Wehtje, E. and P. Adlercreutz** 1997. *Lipases have similar water activity profiles in different reactions*. Biotechnol. Lett. **19**(6): p. 537-540.

- 
188. **Marty, A., W. Chulalaksananukul, R.M. Willemot, and J.S. Condoret** 1992. *Kinetics of lipase-catalyzed esterification in supercritical CO<sub>2</sub>*. *Biotechnol. Bioeng.* **39**(3): p. 273-280.
189. **Condoret, J.-S., S. Vankan, X. Joulia, and A. Marty** 1997. *Prediction of water adsorption curves for heterogeneous biocatalysis in organic and supercritical solvents*. *Chem. Eng. Sci.* **52**(2): p. 213-220.
190. **Reslow, M., P. Adlercreutz, and B. Mattiasson** 1988. *On the importance of the support material for bioorganic synthesis*. *Eur. J. Biochem.* **172**(3): p. 573-578.
191. **Bell, G., P.J. Halling, L. May, B.D. Moore, D.A. Robb, R. Ulijn, R.H. Valivety, E.N. Vulfson, P.J. Halling, and H.L. Holland** 2001. *Methods for measurement and control of water in nonaqueous biocatalysis*. *Methods in Biotechnology.* **15**: p. 105-126.
192. **Chulalaksananukul, W., J.S. Condoret, P. Delorme, and R.M. Willemot** 1990. *Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane*. *FEBS Lett.* **276**(1-2): p. 181-184.
193. **Marty, A., W. Chulalaksananukul, J.S. Condoret, R.M. Willemot, and G. Durand** 1990. *Comparison of lipase-catalysed esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane*. *Biotechnol. Bioeng.* **12**(1): p. 11-16.
194. **Sandoval, G.C., A. Marty, and J.S. Condoret** 2001. *Thermodynamic activity-based enzyme kinetics: efficient tool for nonaqueous enzymology*. *AIChE J.* **47**(3): p. 718-726.
195. **Calabrò, V., E. Ricca, M.G. De Paola, S. Curcio, and G. Iorio** 2009. *Kinetics of enzymatic trans-esterification of glycerides for biodiesel production*. *Bioprocess Biosyst. Eng.*: p. 1-10.
196. **Dossat, V., D. Combes, and A. Marty** 2002. *Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil*. *Enzyme. Microb. Technol.* **30**(1): p. 90-94.
197. **El Rassy, H., A. Perrard, and A.C. Pierre** 2004. *Application of lipase encapsulated in silica aerogels to a transesterification reaction in hydrophobic and hydrophilic solvents: Bi-Bi Ping-Pong kinetics*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **30**(3-4): p. 137-150.
198. **Segel, I.H.** 1975. *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*.
199. **Al-Zuhair, S., A. Dowaidar, and H. Kamal** 2009. *Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase*. *Biochem. Eng. J.* **44**(2-3): p. 256-262.

- 
200. **Al-Zuhair, S., F.W. Ling, and L.S. Jun** 2007.*Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase*. *Process Biochem.* **42**(6): p. 951-960.
201. **Hari Krishna, S. and N.G. Karanth** 2001.*Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: A kinetic study*. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol.* **1547**(2): p. 262-267.
202. **Janssen, A.E.M., B.J. Sijnsnes, A.V. Vakurov, and P.J. Halling** 1999.*Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: correct model and solvent effects on parameters*. *Enzyme. Microb. Technol.* **24**(8-9): p. 463-470.
203. **van Tol, J.B.A., R.M.M. Stevens, W.J. Veldhuizen, J.A. Jongejan, and J.A. Duine** 1995.*Do organic solvents affect the catalytic properties of lipase? Intrinsic kinetic parameters of lipases in ester hydrolysis and formation in various organic solvents*. *Biotechnol. Bioeng.* **47**(1): p. 71-81.
204. **Du, W., Y.-Y. Xu, D.-H. Liu, and Z.-B. Li** 2005.*Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **37**(1-6): p. 68-71.
205. **Compton, D.L., K.E. Vermillion, and J.A. Laszlo** 2007.*Acyl migration kinetics of 2-monoacylglycerols from soybean oil via <sup>1</sup>H NMR*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **84**(4): p. 343-348.
206. **Fureby, A.M., C. Virto, P. Adlercreutz, and B. Mattiasson** 1996.*Acyl group migrations in 2-monoolein*. *Biocatal. Biotransform.* **14**(2): p. 89-111.
207. **Laszlo, J.A., D.L. Compton, and K.E. Vermillion** 2008.*Acyl migration kinetics of vegetable oil 1, 2-diacylglycerols*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **85**(4): p. 307-312.
208. **Xu, X., A.R.H. Skands, C.E. Høy, H. Mu, S. Balchen, and J. Adler-Nissen** 1998.*Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: elucidation of acyl migration by response surface design*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**(12): p. 1179-1186.
209. **Boswinkel, G., J.T.P. Derksen, K. Van't Riet, and F.P. Cuperus** 1996.*Kinetics of acyl migration in monoglycerides and dependence on acyl chainlength*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**(6): p. 707-711.
210. **Chen, X., W. Du, and D. Liu** 2008.*Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil*. *Biochem. Eng. J.* **40**(3): p. 423-429.

- 
211. **Lee, K.T., T.A. Foglia, and K.S. Chang** 2002.*Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease.* Journal of the American Oil Chemists' Society. **79**(2): p. 191-195.
212. **Li, L., W. Du, D. Liu, L. Wang, and Z. Li** 2006.*Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium.* J. Mol. Catal. B: Enzym. **43**(1-4): p. 58-62.
213. **Liu, Y., H. Tan, X. Zhang, Y. Yan, and B.H. Hameed.***Effect of monohydric alcohols on enzymatic transesterification for biodiesel production.* Chemical Engineering Journal. **157**(1): p. 223-229.
214. **Wang, L., W. Du, D. Liu, L. Li, and N. Dai** 2006.*Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system.* J. Mol. Catal. B: Enzym. **43**(1-4): p. 29-32.
215. **Köse, Ö., M. Tüter, and H.A. Aksoy** 2002.*Immobilized Candida antarctica lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium.* Bioresour. Technol. **83**(2): p. 125-129.
216. **Salis, A., M. Pinna, M. Monduzzi, and V. Solinas** 2005.*Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis.* J. Biotechnol. **119**(3): p. 291-299.
217. **Rodrigues, R.C., G. Volpato, K. Wada, and M.A.Z. Ayub** 2008.*Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols.* J. Am. Oil Chem. Soc. **85**(10): p. 925-930.
218. **Soumanou, M.M. and U.T. Bornscheuer** 2003.*Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils.* Eur. J. Lipid Sci. Technol. **105**(11): p. 656-660.
219. **Dizge, N., B. Keskinler, and A. Tanriseven** 2009.*Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer.* Biochem. Eng. J. **44**(2-3): p. 220-225.
220. **Dizge, N. and B. Keskinler** 2008.*Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase.* Biomass Bioenergy. **32**(12): p. 1274-1278.
221. **Iso, M., B. Chen, M. Eguchi, T. Kudo, and S. Shrestha** 2001.*Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase.* J. Mol. Catal. B: Enzym. **16**(1): p. 53-58.
222. **Abigor, R., P. Uadia, T. Foglia, M. Haas, K. Jones, E. Okpefa, J. Obibuzor, and M. Bafor** 2000.*Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils.* Biochem. Soc. Trans. **28**: p. 979-981.

- 
223. **Jeong, G.T. and D.H. Park** 2008.*Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert-butanol*. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. **148**: p. 131-139.
224. **Du, W., D. Liu, L. Li, and L. Dai** 2007.*Mechanism exploration during lipase-mediated methanolysis of renewable oils for biodiesel production in a tert-butanol system*. *Biotechnol. Prog.* **23**(5): p. 1087-1090.
225. **Deng, L., T. Tan, F. Wang, and X. Xu** 2003.*Enzymatic production of fatty acid alkyl esters with a lipase preparation from Candida sp.* 99-125. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**(12): p. 727-734.
226. **Royon, D., M. Daz, G. Ellenrieder, and S. Locatelli** 2007.*Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent*. *Bioresour. Technol.* **98**(3): p. 648-653.
227. **Liu, Y., H. Tan, X. Zhang, Y. Yan, and B.H. Hameed** 2010.*Effect of monohydric alcohols on enzymatic transesterification for biodiesel production*. *Chem. Eng. J.* **157**: p. 223–229
228. **Hsu, A.F., K. Jones, T.A. Foglia, and W.N. Marmer** 2002.*Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **36**(3): p. 181-186.
229. **Wu, W.H., T.A. Foglia, W.N. Marmer, and J.G. Phillips** 1999.*Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**(4): p. 517-521.
230. **Hsu, A.F., K. Jones, W.N. Marmer, and T.A. Foglia** 2001.*Production of alkyl esters from tallow and grease using lipase immobilized in a phyllosilicate sol-gel*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**(6): p. 585-588.
231. **Hsu, A.F., K.C. Jones, T.A. Foglia, and W.N. Marmer** 2004.*Continuous production of ethyl esters of grease using an immobilized lipase*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **81**(8): p. 749-752.
232. **Watanabe, Y., Y. Shimada, A. Sugihara, and Y. Tominaga** 2001.*Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**(7): p. 703-707.
233. **Tan, T., K. Nie, and F. Wang** 2006.*Production of biodiesel by immobilized Candida sp. lipase at high water content*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **128**(2): p. 109-116.

- 
234. **Nie, K., F. Xie, F. Wang, and T. Tan** 2006.*Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production*. J. Mol. Catal. B: Enzym. **43**(1-4): p. 142-147.
235. **Tamalampudi, S., M.R. Talukder, S. Hama, T. Numata, A. Kondo, and H. Fukuda** 2008.*Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst*. Biochem. Eng. J. **39**(1): p. 185-189.
236. **Kumari, A., P. Mahapatra, V.K. Garlapati, and R. Banerjee** 2009.*Enzymatic transesterification of Jatropha oil*. Biotechnol. Biofuels. **2**(1): p. 1.
237. **Matassoli, A.L.F., I.N.S. Corrêa, M.F. Portilho, C.O. Veloso, and M.A.P. Langone** 2009.*Enzymatic Synthesis of Biodiesel via Alcoholysis of Palm Oil*. Appl. Biochem. Biotechnol. **155**: p. 347–355.
238. **Halim, S.F.A. and A. Harun Kamaruddin** 2008.*Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system*. Process Biochem. **43**(12): p. 1436-1439.
239. **Talukder, M.M.R., J.C. Wu, T.B. Van Nguyen, N.M. Fen, and Y.L.S. Melissa** 2009.*Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods*. J. Mol. Catal. B: Enzym. **60**(3-4): p. 106-112.
240. **de Oliveira, D., M. Di Luccio, C. Faccio, C.D. Rosa, J.P. Bender, N. Lipke, S. Menoncin, C. Amroginski, and J.V. de Oliveira** 2004.*Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium*. Appl. Biochem. Biotechnol. **115**(1): p. 771-780.
241. **Demirkol, S., H.A. Aksoy, M. Tüter, G. Ustun, and D.A. Sasmaz** 2006.*Optimization of enzymatic methanolysis of soybean oil by response surface methodology*. J. Am. Oil Chem. Soc. **83**(11): p. 929-932.
242. **Shieh, C.J., H.F. Liao, and C.C. Lee** 2003.*Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology*. Bioresour. Technol. **88**(2): p. 103-106.
243. **Hernández-Martín, E. and C. Otero** 2008.*Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM*. Bioresour. Technol. **99**(2): p. 277-286.
244. **Chen, J.-W. and W.-T. Wu** 2003.*Regeneration of immobilized Candida antarctica lipase for transesterification*. J. Biosci. Bioeng. **95**(5): p. 466-469.

- 
245. **Samukawa, T., M. Kaieda, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda, and H. Fukuda** 2000.*Pretreatment of immobilized Candida antarctica lipase for biodiesel fuel production from plant oil*. J. Biosci. Bioeng. **90**(2): p. 180-183.
246. **Zheng, Y., J. Quan, X. Ning, L.-M. Zhu, B. Jiang, and Z.-Y. He** 2009.*Lipase-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production in tert-amyl alcohol*. World J. Microbiol. Biotechnol. **25**: p. 41–46.
247. **Watanabe, Y., Y. Shimada, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, and Y. Tominaga** 2000.*Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized Candida antarctica lipase*. J. Am. Oil Chem. Soc. **77**(4): p. 355-360.
248. **Shimada, Y., Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, and Y. Tominaga** 1999.*Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized Candida antarctica lipase*. J. Am. Oil Chem. Soc. **76**(7): p. 789-793.
249. **Du, W., Y. Xu, and D. Liu** 2003.*Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation*. Biotechnol. Appl. Biochem. **38**: p. 103-106.
250. **Watanabe, Y., Y. Shimada, A. Sugihara, and Y. Tominaga** 2002.*Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized Candida antarctica lipase*. J. Mol. Catal. B: Enzym. **17**(3-5): p. 151-155.
251. **Kojima, S., D. Du, M. Sato, and E.Y. Park** 2004.*Efficient production of fatty acid methyl ester from waste activated bleaching earth using diesel oil as organic solvent*. J. Biosci. Bioeng. **98**(6): p. 420-424.
252. **Nassreddine, S., A. Karout, M. Lorraine Christ, and A.C. Pierre** 2008.*Transesterification of a vegetal oil with methanol catalyzed by a silica fibre reinforced aerogel encapsulated lipase*. Appl. Catal., A. **344**(1-2): p. 70-77.
253. **Yesiloglu, Y.** 2004.*Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil*. J. Am. Oil Chem. Soc. **81**(2): p. 157-160.
254. **Selmi, B. and D. Thomas** 1998.*Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium*. J. Am. Oil Chem. Soc. **75**(6): p. 691-695.
255. **Ognjanovic, N., D. Bezbradica, and Z. Knezevic-Jugovic** 2009.*Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability*. Bioresour. Technol. **100**(21): p. 5146-5154.
256. **Soumanou, M.M. and U.T. Bornscheuer** 2003.*Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil*. Enzyme. Microb. Technol. **33**(1): p. 97-103.

- 
257. **Dossat, V., D. Combes, and A. Marty** 1999. *Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production*. *Enzyme. Microb. Technol.* **25**(3-5): p. 194-200.
258. **Laane, C., S. Boeren, K. Vos, and C. Veeger** 1987. *Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents*. *Biotechnol. Bioeng.* **30**(1): p. 81-87.
259. **Graber, M., R. Irague, E. Rosenfeld, S. Lamare, L. Franson, and K. Hult** 2007. *Solvent as a competitive inhibitor for Candida antarctica lipase B*. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics.* **1774**(8): p. 1052-1057.
260. **Janssen, A.E.M., N.W. Boer, and K.V. Riet** 1993. *Solvent effects on the equilibrium position of lipase-catalyzed esterification of decanoic acid and various alcohols*. *Biocatal. Biotransform.* **8**(2): p. 133-153.
261. **Bellot, J.C., L. Choisnard, E. Castillo, and A. Marty** 2001. *Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification*. *Enzyme. Microb. Technol.* **28**(4-5): p. 362-369.
262. **Castillo, E., F. Pezzotti, A. Navarro, and A. López-Munguía** 2003. *Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: solvent engineering approach*. *J. Biotechnol.* **102**(3): p. 251-259.
263. **Kamini, N.R. and H. Iefuji** 2001. *Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by Cryptococcus spp. S-2*. *Process Biochem.* **37**(4): p. 405-410.
264. **Watanabe, Y., Y. Shimada, A. Sugihara, and Y. Tominaga** 1999. *Stepwise ethanolysis of tuna oil using immobilized Candida antarctica lipase*. *J. Biosci. Bioeng.* **88**(6): p. 622-626.
265. **Du, W., Y.Y. Xu, J. Zeng, and D.H. Liu** 2004. *Novozym 435-catalyzed transesterification of crude soya bean oils for biodiesel production in a solvent-free medium*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **40**(Pt 2): p. 187.
266. **Li, W., W. Du, and D. Liu** 2007. *Rhizopus oryzae IFO 4697 whole cell catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in tert-butanol system*. *Process Biochem.* **42**(11): p. 1481-1485.
267. **Du, W., Y. Xu, D. Liu, and J. Zeng** 2004. *Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **30**(3-4): p. 125-129.

- 
268. **Jeong, G.T. and D.H. Park** 2009.*Synthesis of Rapeseed Biodiesel Using Short-Chained Alkyl Acetates as Acyl Acceptor*. Appl. Biochem. Biotechnol. **161**(1-8): p. 195-208.
269. **Kim, S.J., S.M. Jung, Y.C. Park, and K. Park** 2007.*Lipase catalyzed transesterification of soybean oil using ethyl acetate, an alternative acyl acceptor*. Biotechnol. Bioprocess Eng. **12**(4): p. 441-445.
270. **Modi, M.K., J.R.C. Reddy, B.V.S.K. Rao, and R.B.N. Prasad** 2007.*Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor*. Bioresour. Technol. **98**(6): p. 1260-1264.
271. **Xu, Y., W. Du, and D. Liu** 2005.*Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor*. J. Mol. Catal. B: Enzym. **32**(5-6): p. 241-245.
272. **Xu, Y., W. Du, D. Liu, and J. Zeng** 2003.*A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium*. Biotechnol. Lett. **25**(15): p. 1239-1241.
273. **Su, E., P. You, and D. Wei** 2009.*In situ lipase-catalyzed reactive extraction of oilseeds with short-chained dialkyl carbonates for biodiesel production*. Bioresour. Technol. **100**(23): p. 5813-5817.
274. **Su, E.-Z., M.-J. Zhang, J.-G. Zhang, J.-F. Gao, and D.-Z. Wei** 2007.*Lipase-catalyzed irreversible transesterification of vegetable oils for fatty acid methyl esters production with dimethyl carbonate as the acyl acceptor*. Biochem. Eng. J. **36**(2): p. 167-173.
275. **Klaas, M.R.g. and S. Warwel** 2001.*Reactive extraction of oilseeds with dialkyl carbonates*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **103**(12): p. 810-814.
276. **Rao, N.N., S. Lütz, K. Würges, and D. Minör** 2009.*Continuous Biocatalytic Processes*. Organic Process Research & Development. **13**: p. 607–616.
277. **Shimada, Y., Y. Watanabe, A. Sugihara, and Y. Tominaga** 2002.*Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing*. J. Mol. Catal. B: Enzym. **17**(3-5): p. 133-142.

## II : PUBLICATION N°1 :

**PRODUCTION CONTINUE D'ESTERS D'ACIDES GRAS A PARTIR  
D'HUILE DE TOURNESOL HAUTEMENT OLEIQUE CATALYSEE PAR  
LES LIPASES.**

---

**Etienne Séverac<sup>a</sup>, Olivier Galy<sup>a</sup>, Fabrice Turon<sup>b</sup>, Pierre Monsan<sup>a</sup> and Alain Marty<sup>a\*</sup>.**

---

<sup>a</sup> 1) Université de Toulouse; INSA,UPS,INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077

Toulouse, France

2) INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse,

France

3) CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

<sup>b</sup> Syngenta Seeds, 12 Chemin du hobit 31790 Saint Sauveur, France

\* Correspondance : Alain Marty, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés, Institut National des Sciences Appliquées, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex4, France, Tel : +33 (0)5 61 55 94 39, Fax : +33 (0)5 61 55 94 00, Email : [alain.marty@insa-toulouse.fr](mailto:alain.marty@insa-toulouse.fr)

---

Soumis dans **Bioresource Technology**

*(impact factor : 4,253)*

---

Titre Abrégé : Production d'esters d'acides gras par les lipases en réacteur continu

## II.1 Résumé

La mise en œuvre des lipases immobilisées nécessite leur optimisation dans des réacteurs de type continu, afin d'en réduire l'impact économique sur le produit fini. Ainsi, il convient de développer des réacteurs continus à lit fixe, extrêmement stables dans le temps, permettant des taux de conversion importants et hautement productifs. Les huiles brutes ont la particularité de contenir une quantité importante de composés mineurs (phospholipides, stérols, tocophérols etc...), leur procurant des qualités de stabilité oxydative hors normes. Leur transformation présente, de plus, l'avantage de s'affranchir des étapes de raffinage pouvant être coûteuses.

Néanmoins, la transestérification des huiles vierges est problématique. En effet, les phospholipides, au même titre que le glycérol produit en cours de réaction, sont des molécules polaires, qui, placées dans un milieu réactionnel apolaire défavorable, sont susceptibles de s'adsorber sur le support enzymatique. Une barrière hydrophile se forme autour du biocatalyseur, et les transferts des triacylglycérols substrats vers l'enzyme ou des esters produits de la lipase vers le milieu réactionnel sont limités. En réacteur continu, cela se traduit par une accumulation des composés polaires dans le réacteur, pouvant entraîner la perte totale de l'activité enzymatique. Les solvants de polarité moyenne (*tert*-butanol, 2-méthyl-2-butanol *etc.*) permettent de solubiliser à la fois les composés polaires et les composés apolaires et donc de limiter voire d'éliminer ces effets néfastes.

Quatre lipases immobilisées disponibles dans le commerce (Novozyme 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM et Lipase PS Amano IM) ont été testées en réacteur discontinu, sur des réactions de transestérification butylique de l'huile de tournesol hautement oléique, en présence ou en absence de *tert*-butanol en tant que solvant. Le Lipozyme RM IM présente un faible taux de conversion de l'huile. Le Lipozyme TL IM et la lipase PS Amano IM, toutes

deux lipases régio-spécifiques des positions *sn1* et *sn3* des triglycérides, présentent des vitesses de conversion importantes des triacylglycérols mais des rendements de production d'esters butyliques modestes ; leur régiospécificité ne leur permet pas (ou difficilement) de transformer les *sn1,2*-diacylglycerols et de *sn2*-monoacylglycérols qu'elles produisent et qui s'accumulent dans le milieu, du fait d'une faible migration d'acyle observée dans les conditions définies.

Novozyme 435, la lipase B de *Candida antarctica*, ne présente pas de régio-spécificité pour les positions des esters d'acides gras sur le squelette de glycérol. Ainsi, même si elle n'est pas la lipase montrant les vitesses de réaction les plus importantes, elle permet une optimisation des rendements de production d'esters en minimisant les productions de diacylglycérols (DAG) et de monoacylglycérols (MAG). Cette lipase immobilisée a donc été sélectionnée pour le développement d'un réacteur à lit fixe, catalysant la réaction de butanololyse de l'huile de tournesol hautement oléique non raffinée. Un ratio molaire entre butanol et triacylglycérols de 5 s'est avéré être le meilleur compromis afin de réduire au maximum les taux de TAG, de DAG et MAG résiduels.

La polarité du milieu réactionnel s'avère être un facteur clé de l'optimisation du réacteur enzymatique. L'effet de la polarité du milieu sur les performances du réacteur a été démontré en alimentant le réacteur avec différentes concentrations initiales en huile.

Premièrement, l'abaissement de la polarité du milieu par adjonction de *tert*-butanol permet d'éliminer les effets néfastes des phospholipides de l'huile sur la lipase en milieu sans solvant. En contre partie, la faible polarité du milieu favorise une production résiduelle de MAG dans le produit final malgré un fort excès d'alcool co-substrat (rendement en MAG résiduels de 10,4%). Ces derniers ne sont plus produits dans des milieux plus hydrophobes (milieu sans solvant) qui favorisent donc la production d'esters (rendement de production d'esters de 99,6%).

La polarité du milieu réactionnel affecte également l'activité de l'enzyme et donc le débit d'équilibre et finalement, la productivité du réacteur. Débit et productivité sont croissantes jusqu'à une concentration initiale en huile de 450mM. Au-delà de cette concentration, le débit à l'équilibre diminue de manière constante, jusqu'aux conditions de milieu sans solvant pour lequel le débit est extrêmement faible.

Ainsi, une haute productivité s'accompagne de la présence de MAG résiduels dans une proportion non négligeable et, inversement, une grande pureté en esters est synonyme d'une faible productivité. Alimenter le réacteur avec un mélange contenant 500 mM d'huile constitue le meilleur compromis entre pureté d'esters (teneur résiduelle en MAG de 3,75 % mol) et productivité.

Dans ces conditions, les phénomènes de partage des PLs et du glycérol entre le milieu réactionnel et le support enzymatique sont contrôlés. Aucune perte de stabilité n'a été observée sur une période de 50 jours de fonctionnement continu du réacteur. Une productivité de 13,8 tonnes par an et par kg de Novozyme 435 est obtenue. Le coût ajouté par l'enzyme sur le produit final a été calculé à 0,08euros par kg d'esters synthétisés.

Mots clés : Novozyme 435, transestérification, réacteur à lit fixe, esters d'acides gras, huiles vierges de tournesol hautement oléique, thermodynamique, productivité, stabilité.

**CONTINUOUS LIPASE-CATALYZED PRODUCTION OF ESTERS FROM  
CRUDE HIGH OLEIC SUNFLOWER OIL.**

---

**Etienne Séverac<sup>a</sup>, Olivier Galy<sup>a</sup>, Fabrice Turon<sup>b</sup>, Pierre Monsan<sup>a</sup> and Alain Marty<sup>a\*</sup>.**

<sup>a</sup> 1) Université de Toulouse; INSA,UPS,INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077  
Toulouse, France

2) INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse,  
France

3) CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

<sup>b</sup> Syngenta Seeds, 12 Chemin du hobit 31790 Saint Sauveur, France

\* Correspondence : Alain Marty, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et  
Procédés, Institut National des Sciences Appliquées, 135 Avenue de Rangueil, 31077  
Toulouse Cedex4, France, Tel : +33 (0)5 61 55 94 39, Fax : +33 (0)5 61 55 94 00, Email :  
alain.marty@insa-toulouse.fr

---

Submitted in **Bioresource Technology**

*(impact factor : 4,253)*

---

Abbreviated Title: Production of fatty acid alkyl esters by lipases in continuous reactor

## **II.2 Abstract**

The objective was to develop an economically relevant enzymatic process of butyl ester production using high oleic sunflower oil. A stable continuous reactor fed with crude oil was optimized, even if phospholipids were described as detrimental for lipase activity. Novozyme 435 provided the best compromise between activity and butyl-ester yield. The polarity of the medium was a key factor to insure the stability of the process. It enables the negative effects of phospholipids contained in crude oil or of produced glycerol to be controlled. After optimization, a product containing 96.5 mol % butyl esters with a high productivity of 13.8 tons.year<sup>-1</sup>.kg Novozyme 435<sup>-1</sup> was obtained over 50 days. A versatile continuous process for ester production was thus optimized leading to great performances and low cost of enzyme use. Moreover, the possibility to use crude oil would confer to the product high resistance to oxidation that is appreciated by end-users.

Key words: Novozyme 435, transesterification, packed bed reactor, fatty acid alkyl esters, crude high oleic sunflower oil, thermodynamics, productivity, stability

## **II.3 Introduction**

Faced with the shortage of reserve fossil resources and the climate disorder due to the emission of greenhouse-effect gases, the development of substitution resources of vegetable origin is urgent. The upgrading of plant oils through the production of fatty acid alkyl esters (FAAE) is thus a subject of great interest in many industries (Schörken and Kempers 2009). With various physico-chemical properties, which depend on both the nature of the feedstock (fatty acids) and the alkyl moiety, fatty acid alkyl esters are involved in a wide range of industrial applications such as bio-carburant, bio-lubricants, bio-solvents, hydraulic fluids, drilling fluids and cosmetics (Dossat et al. 2002; Knothe et al. 2005; Medina Gonzalez et al. 2007).

Among the natural fatty acids (FA) entering in the composition of oil triacylglycerols (TAG), oleic acid has a prime position. With its unique double bond, it presents relevant industrial properties such as good fluidity at low temperature, unlike saturated FA and good oxidative stability unlike poly-unsaturated FA. Oleic acid is the main FA of high-oleic sunflower oils (HOSO) reaching 75% and up to 90% of the total FA (Warner et al. 2003). Crude oils are obtained directly after oilseed crushing and/or extraction without further purification. In addition to triglycerides, crude oils contain several minor components like phospholipids (up to 2% in sunflower oil), tocopherols (450 to 1200 mg/kg in sunflower oil, with a majority of  $\alpha$ -tocopherols) and sterols (2400 to 5000 mg/kg in sunflower oil) (Warner et al. 2003). These minor components of oil are recognized as antioxidants (Jain and Sharma 2010). The direct transesterification of crude HOSO would present the advantage of reducing costs due to refining and mainly to preserve the natural antioxidant power of the resulting esters.

The transesterification of TAG with an alcohol produces 3 equivalents of ester molecules and 1 equivalent of glycerol through three successive reactions, with diacylglycerols (DAG) and

monoacylglycerols (MAG) as intermediates. Classical synthesis of FAAE from oil is accomplished via chemical alkali- or acid-catalyzed transesterification. Although these chemical approaches give high substrate conversion with high reaction rates, they do have some disadvantages. This chemical synthesis route often presents poor reaction selectivity leading to the synthesis of by-products (for instance if a mixture of esters and monoglycerides is the target). The chemical processes often consume large amounts of energy. The recovery of glycerol is often difficult and generates large amounts of alkaline waste water that has to be treated (Parawira 2009; Szczesna Antczak et al. 2009). In the last few years, the research of alternative routes for alkyl ester production has demonstrated the ability of lipases to catalyze the transesterification of triacylglycerols.

The efficiency and high operational stability of lipases (formally called, triacylglycerol acylhydrolases, EC.3.1.1.3) in batch transesterification has been widely reported, demonstrating the possibility to recycle the enzyme with the use of an organic solvent (Du et al. 2007; Talukder et al. 2009) or in solvent-free systems (Shimada et al. 1999; Watanabe et al. 2000). Plug flow reactors have been successfully developed (Watanabe et al. 2001; Dossat et al. 2002; Shimada et al. 2002). In spite of the enormous possibilities and the great interest in enzymatic catalysis, industrial alkyl ester production involving lipases is still very limited. The main drawback of enzyme-catalyzed processes is the high cost of the lipases. To decrease the operational costs of the biocatalyst, the process must be optimized using an immobilized enzyme in a stable and highly productive continuous reactor. Ideally the reactor has to ensure steady-state production with a high conversion yield for months at a time without changing the enzyme. A packed-bed reactor (PBR) generally leads to higher performance than a continuous stirred-tank reactor. In addition, the volumes are reduced, the technology is less expensive (no mobile parts) and enzyme support attrition is avoided (Balcão et al. 1996; Rao et al. 2009).

To insure the stability of a continuous packed-bed reactor for synthesis of FAAE, the crucial point is the control of the partition of polar compounds between the reaction medium and the supported enzyme (Marty et al. 1997; Colombie et al. 1998). For instance, glycerol creates a hydrophilic hindrance around the enzyme resulting in diffusion limitations of hydrophobic substrates from the liquid phase to the enzyme which reduces the enzyme activity (Dossat et al. 1999). To avoid this phenomenon, the reaction medium has to be able to rid the reactor of the glycerol formed. Polar solvents like *tert*-butanol or 2-methyl-2-butanol have the ability to dissolve both polar and non-polar compounds. Several works have demonstrated that these solvents can eliminate the detrimental side-effects of glycerol production (Du et al. 2007; Royon et al. 2007; Talukder et al. 2009).

Another way to reduce costs is to develop a continuous enzymatic process fed with crude oil. However, the few trials in this sense led to a rapid inactivation of the lipase. During solvent-free transesterification of crude soyabean oil (Watanabe et al. 2002; Du et al. 2004) and crude palm oil (Talukder et al. 2009), phospholipids (PLs) were suspected of being at the origin of the low yields and of the low operational stability of the catalyst during repeated batch reactions. Watanabe et al (2002) was the first to report that the adsorption of PLs onto the enzymatic support led to this loss in activity. Nevertheless, one can assume that glycerol and PL adsorption must depend both on the solvent and the support polarity, and consequently, it remains of interest to persist in this way.

In this work, our objective was to develop an efficient enzymatic continuous reactor using crude high oleic sunflower oil to produce fatty acid butyl-esters containing a majority of butyl-oleate, presenting principally lubricant properties. The strategy was to select the best commercial immobilized enzyme from the point of view of activity, selectivity and conversion, and to manage the polarity of the solvent and of the support in order to insure a

stable continuous synthesis by avoiding both glycerol and phospholipid negative effect on the enzyme.

Use of crude oils will decrease the price of the raw material. Development of a stable continuous reactor would decrease the cost of the enzyme by producing tons of esters per kg of enzyme. Finally, the higher resistance to oxidation of the final product will be greatly appreciated by the market. It will thus be possible to obtain an economically relevant process producing a molecule with improved properties.

## II.4 Material and Methods

### II.4.1 Materials

Four commercial immobilized lipases were obtained from different sources. Their characteristics are summarized in table 1.

**Table II.4-1** Characteristics of the immobilized lipase tested for transesterification of high-oleic sunflower oil.

Commercial name	Enzyme origin	Support	Hydrophobicity/philicity	Source
Novozyme 435	<i>Candida antarctica form B</i>	Lewatit VP OC 1600	Medium hydrophobic	Novozymes (Denmark)
Lipozyme RM IM	<i>Rhizomucor miehei</i>	Duolite A568	Hydrophilic	Novozymes (Denmark)
Lipozyme TL IM	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Silica granules	Hydrophilic	Novozymes (Denmark)
Lipase PS Amano IM	<i>Burkholderia cepacia</i>	Diatomaceous earth	Hydrophilic	Amano (Japan)

High oleic sunflower oil was supplied by Syngenta Seeds (Toulouse, France) and contained 85.7% oleic acid, 5.1% linoleic acid, 3.6% stearic acid, and 3.5% palmitic acid and 2.1% of minor fatty acids; the main triglyceride present in the oil was triolein. The average molecular

weight for HOSO was calculated at  $881 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . 99% trioleoyl-glycerol, 99% *sn*1,3 dioleoyl-glycerol, 99% *sn*1(3) monooleoyl-glycerol and 3Å molecular sieve were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals and solvents were of highest purity and were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium).

#### **II.4.2 Batch reactions**

Reactions were performed in glass tubes. The reaction involved using the correct amount of crude or refined oil and butanol to fit the desired molar ratio in the presence or absence of *tert*-butanol. The reaction mixture, previously dried with molecular sieve, was incubated at 40°C for catalysis by Lipozyme RM IM<sup>®</sup>, Lipozyme TL IM<sup>®</sup> and Lipase PS amino IM and 60°C with Novozyme 435<sup>®</sup>. Reactions were kept under magnetic stirring (250 rpm) and were initiated by addition of the immobilized lipase. The changes in concentration were determined, in each case, by withdrawing samples from the medium. The sample was diluted in acetone and concentrations of all the products and reactants were determined by HPLC.

#### **II.4.3 Continuous reaction.**

The reactor was a fixed-bed type. It consisted of a column (10 mm diameter), maintained at 60°C and containing 10 g Novozyme 435 (bed length: 11 cm). The reaction medium containing crude HOSO (concentration from 200 mM to 650 mM) and butanol (molar alcohol/oil ratio from 3 to 7) in *tert*-butanol, previously dried with molecular sieve, was pumped using an ISO-3100SD Isocratic Pump (Dionex, USA) percolating the packed bed of enzyme. Solvent free medium, only containing the two substrates (molar ratio: 5), was treated by the same system. At the outlet of the reaction vessel, samples were collected and analyzed.

#### II.4.4 Analytical methods.

The product and residual reactant concentrations were analyzed using a Dionex Ultimate 3000 HPLC equipped with a 380-LC Evaporative Light Scattering Detector, (Varian, USA) and a reverse-phase analytical Prontosyl C30 column (ICS, France) (250 mm × 4 mm × 5 μm). The nebulisation and evaporation temperatures were kept at 35°C and 40°C respectively. The nitrogen flow-rate was fixed at 1 l.min<sup>-1</sup>.

A 40-min ternary gradient with two linear gradient steps was employed: reservoir A contained pure water, reservoir B contained acetonitrile and reservoir C contained 2-propanol-hexane (5:4, v/v). Gradients were as follows: 30% A+70% B in 0 min, 100% B in 15min, 50% B+50% C in 30 min, followed by isocratic elution with 50% B+50% C for the last 10min. The flow rate was 1ml.min<sup>-1</sup> and oven temperature set at 40°C. Elution order was: monoacylglycerols, free fatty acids, butyl esters, diacylglycerols and triacylglycerols. The separation of *sn1(3)*-MAG/*sn2*-MAG forms and *sn1,3*-DAG/*sn1(3)*,2DAG forms is effective.

TAG conversion and, DAG, MAG and ester yields were calculated according to equations II-1 to II-4 respectively where [Esters]<sub>*t*</sub> is the Ester concentration at time *t*, [MAG]<sub>*t*</sub> is the MAG concentration at time *t*, [DAG]<sub>*t*</sub> is the DAG concentration at time *t* and [TAG]<sub>*t*</sub> is the TAG concentration at time *t*. The subscript 0 refers to concentration at the initial time.

---

$$X_{TAG} = 1 - \frac{[TAG]_t}{[TAG]_0} \quad (\text{Eq. II-1})$$

$$X_{DAG} = \frac{[DAG]_t}{[TAG]_0} \quad (\text{Eq. II-2})$$

$$X_{MAG} = \frac{[MAG]_t}{[TAG]_0} \quad (\text{Eq. II-3})$$

$$X_{ester} = \frac{[Ester]_t}{3x[TAG]_0} \quad (\text{Eq. II-4})$$

## **II.5 Results and Discussion.**

The main objective of this work was to optimize an efficient continuous enzymatic packed bed reactor (PBR) for the transesterification of crude high oleic sunflower oil (HOSO) with butanol. As enzymologists aiming to develop an economically relevant process, we first had to select an appropriate enzyme and reaction medium. We decided to focus on immobilized enzymes commercially available on a large scale. The choice of the reaction medium is crucial because it influences the enzyme activity, conversion at thermodynamic equilibrium, selectivity, solubility of substrates and products and consequently the stability of the reactor. Ideally, a solvent-free process should be used. However, in many cases, the presence of a solvent is essential, to ensure catalysis (Iso et al. 2001), to control the partition of polar compounds between the medium and the immobilized lipase (Halling 1990) and to orientate the thermodynamic equilibrium (Janseen et al. 1993).

In the present study, we proposed to explore both these options. The solvent we chose was *tert*-butanol, a solvent of medium polarity, able to solubilize both glycerol and other polar

compounds (phospholipids, etc.) as well as apolar compounds (TAG, DAG, MAG and esters). The choice of *tert*-butanol was motivated by its ability to preserve the activity of Novozyme 435 and to improve its stability (Du et al. 2007). 2-methyl-2-butanol was also tested and gave similar results (data not shown) but *tert*-butanol presents additional advantages such as relatively low cost and a low boiling point facilitating its evaporation and recovery during down-stream processes.

### **II.5.1 Lipase screening in batch reactions.**

Four commercial immobilized lipases, namely Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, Lipase PS Amano IM and Novozyme 435, were screened to select the one offering the best performance, with and without *tert*-butanol as solvent in batch reactions. A butanol-to-triglyceride molar ratio of 4 was applied to shift the thermodynamic equilibrium towards ester synthesis. In order to assess the effect of *tert*-butanol, initial TAG concentrations of 200 mM in *tert*-butanol were used. In this condition, the proportion of the solvent represents 73% of the reaction volume. For solvent-free systems, concentrations of 748 mM were obtained for a molar ratio between substrates of 4. Working temperatures for each enzyme were optimized, i.e. 60°C for Novozyme 435 and 40°C for the three other lipases. In order to observe the real behavior of the lipases, refined HOSO was used as substrate in batch reactions to avoid interference from minor components. The progression of TAG conversion and product yields (DAG, MAG and esters) versus time are presented in Figure II.5-1 for medium containing *tert*-butanol and in Figure II.5-2 for solvent-free medium.

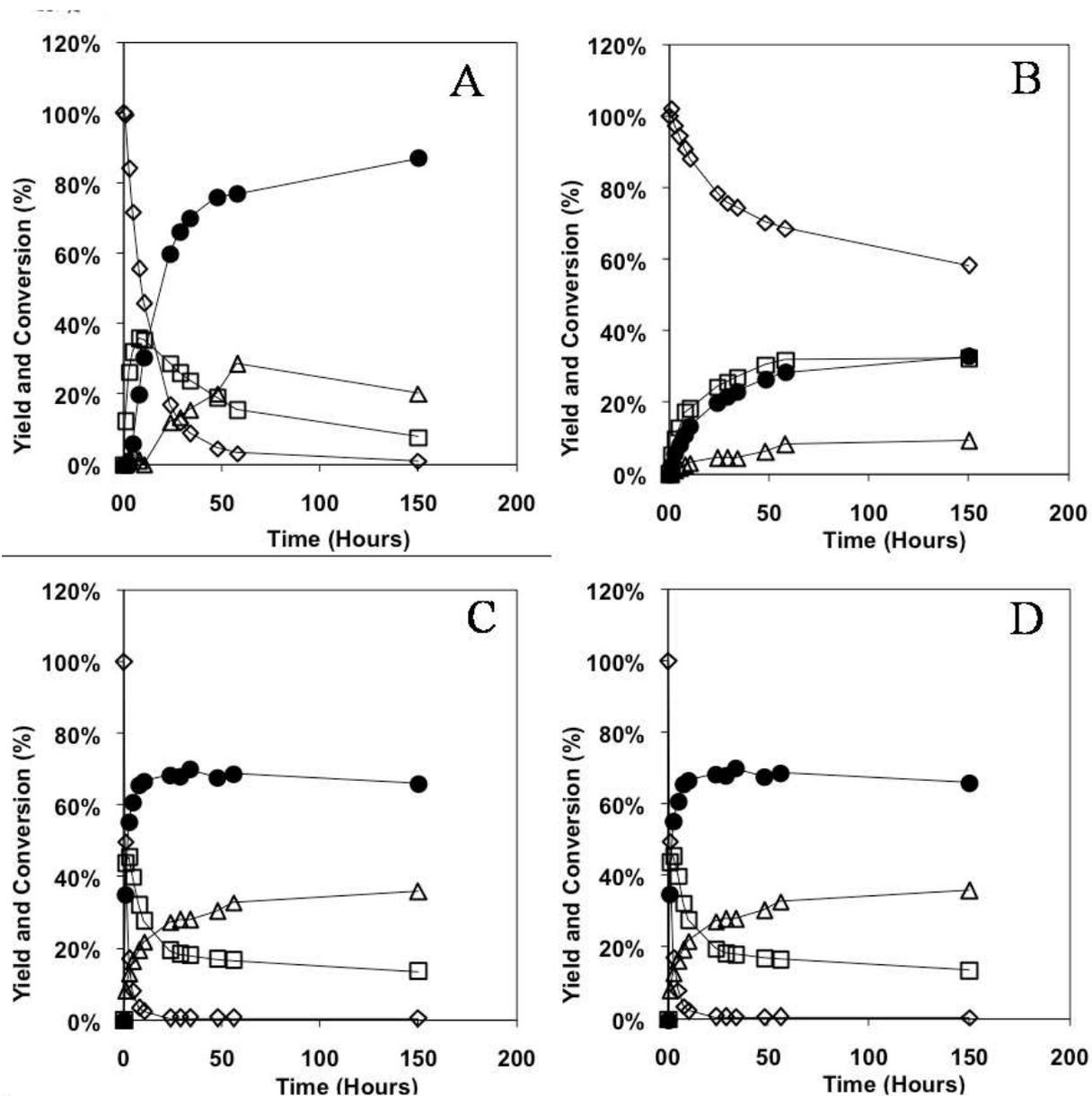


Figure II.5-1 Kinetics of transesterification of refined high-oleic sunflower oil with butanol in *tert*-butanol catalyzed by Novozyme 435 (A) at 60°C, Lipozyme RM IM (B), Lipozyme TL IM (C) and Lipase PS Amano IM (D) at 40°C. Symbols represent the conversion yields of TAG (◇), and DAG (□) MAG (△) and esters (●). Initial conditions: 200 mM refined oil, 800 mM butanol in *tert*-butanol as solvent, 20 mg Novozyme 435, and reaction volume: 10 ml.

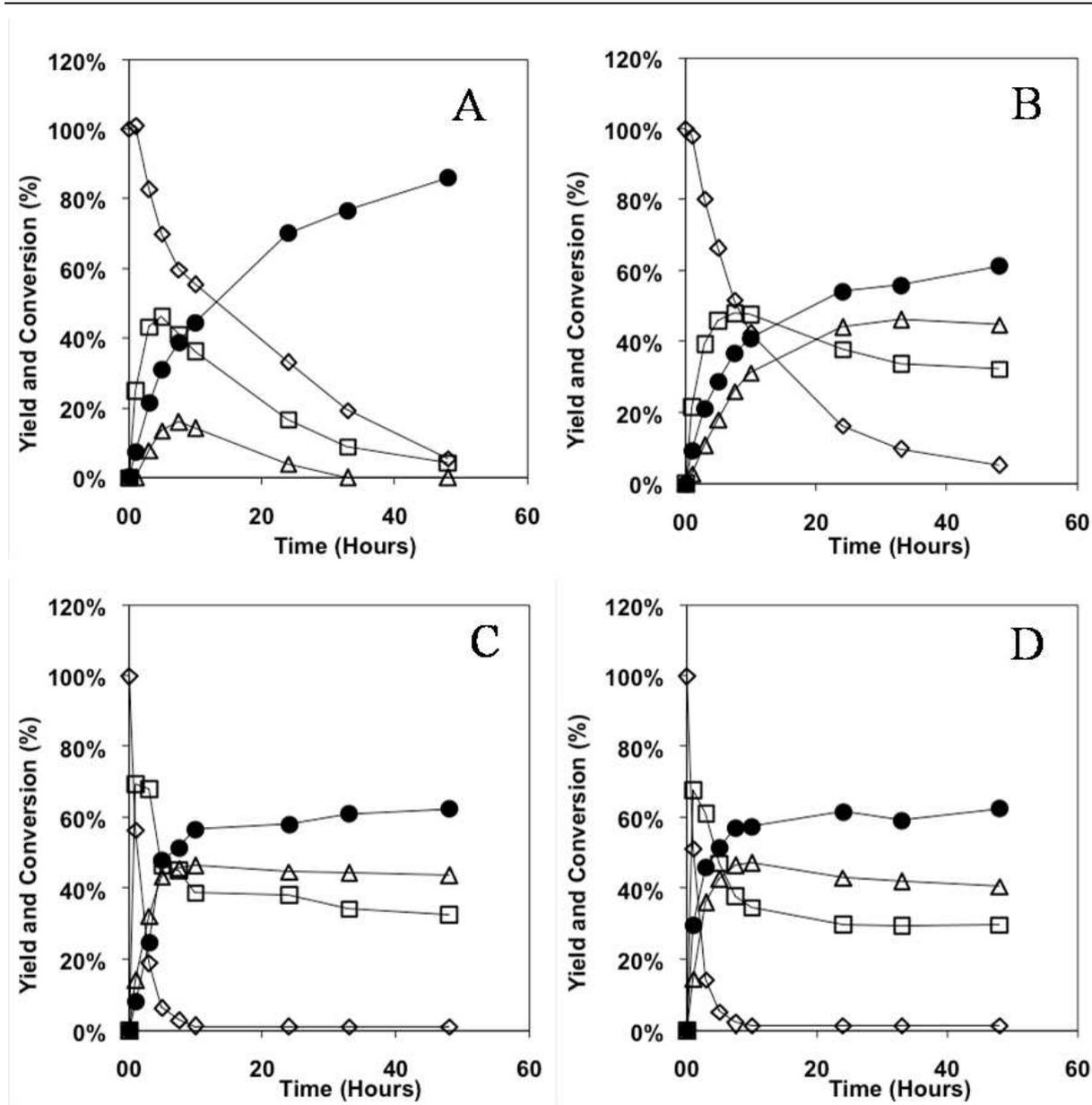


Figure II.5-2 : Kinetics of transesterification of refined high oleic sunflower oil with butanol in solvent free medium catalyzed by Novozyme 435 (A) at 60°C, Lipozyme RM IM (B), Lipozyme TL IM (C) and Lipase PS Amano IM (D) at 40°C. Symbols represent the conversion of TAG (◇) and DAG (□) MAG (△) and esters (●) yields. Initial conditions: 748 mM refined oil, 2930 mM butanol, 20 mg Novozyme 435, and reaction volume: 4 ml.

In both media, Lipozyme RM IM presented the lowest performance. The reaction rate of triglyceride alcoholysis was slow and ester yield remained low.

The behaviours of Lipozyme TL IM and lipase PS Amano IM were similar. After 48 hours in *tert*-butanol and after 10 hours in the solvent-free medium, it can be considered that reactant concentrations were stable. These two enzymes presented a remarkable TAG consumption activity with almost total conversion (99%) obtained after only 10 hours.

In both media, DAGs were rapidly produced in the first 2 hours of reaction to reach a maximum and were re-consumed before equilibrium was reached (30 to 33% in solvent-free medium and 17% in *tert*-butanol). MAG yields reached a maximum of 30-33% after 60 hours in *tert*-butanol medium and ~43% after 10 hours in solvent-free medium. They were slowly re-consumed in the solvent-free system. Butyl esters were more efficiently produced with *tert*-butanol: a final yield of 79% was reached and only 63% in solvent-free conditions.

The DAGs and MAGs produced belonged to the *sn1,2* and *sn2* series. The high proportion of these co-products is assumed to result from the stereospecificity of the two lipases. Indeed, they were previously reported as *sn1,3* regiospecific, as was the lipase from *R. miehei*, (Hernandez-Martin and Otero 2008). An acyl-migration process can occur spontaneously leading to a rearrangement from *sn1(3),2*-DAG and *sn2*-MAG to their respective thermodynamically stable forms (*sn1,3*-DAG and *sn1(3)*-MAG) which can be converted by the lipases. MAGs reach an equilibrium resulting in a *sn2*-MAG:*sn1*-MAG ratio of ~1:9, while long-chain DAGs typically display a ~1:2 ratio of *sn1(3),2*-DAG to *sn1,3*-DAG at equilibrium (Compton et al. 2007; Laszlo et al. 2008). It has been demonstrated that acid and base impurities and enzymatic support carrying charges catalyze acyl-migration (Fureby et al. 1996). Extensive acyl migration occurred in aliphatic hydrocarbons and water-miscible alcohols. In our work, the *sn2*-MAG produced are not converted by this mechanism, suggesting that the reaction media and enzymatic supports do not offer ideal conditions for acyl migration (dry medium, non-water-miscible alcohols). Compton et al. (2007) and Laszlo

et al. (2008) demonstrated that at 40°C and in the absence of catalyzing agent, the acyl-migration is relatively slow: only 20% conversion of *sn2*-MAG into *sn1(3)*-MAG and *sn1(3),2*-DAG into *sn1,3*-DAG were reached in ~120 hours and ~200 hours respectively. Acyl migration was accelerated at 60°C, and 20% conversion was attained in 24 hours for MAG and ~30 hours for DAG.

The complete transesterification of HOSO into glycerol and esters catalyzed by Lipozyme TL IM and Lipase PS amino IM at 40°C is highly limited by the *sn1,3* regiospecificity of these enzymes and by the slow migration rate of *sn2*-MAG and *sn1,2*-MAG at the considered reaction temperature.

Novozyme 435 provided lower activity towards TAGs than the two previous lipases. 95% conversion was only attained after 48h in solvent-free conditions, and in 58h with *tert*-butanol. Novozyme 435, a non-regiospecific lipase, was able to catalyse the transesterification of fatty acid both on *sn1(3)* and *sn2* glycerol positions (Hernandez-Martin and Otero 2008). Indeed, Novozyme 435 was, among the four lipases tested, the lipase which gave the highest yield of butyl esters (around 87% in both media), minimizing DAG production (8% and 4% for *tert*-butanol and solvent-free systems respectively) and MAG production 20% and 0% for *tert*-butanol and solvent-free systems respectively).

The analysis of the final reaction medium showed that MAGs were mainly produced in the form of *sn1*-MAGs. This is thought to be the result of both the enzyme specificity and of acyl-migration which is accelerated at 60°C and possibly enhanced by the enzyme support (Lewatit VP OC).

An extra advantage of Novozyme 435 arises from the fact that it is immobilized on a support that is medium hydrophobic compared to the hydrophilic ones used for the other lipases (table 1). It could limit adsorption of polar compounds present in the medium (glycerol, PLs) in continuous transesterification conditions. Thus, this enzyme was selected for the following experiments.

At this stage, the solvent-free system presents great advantages in terms of conversion and selectivity. Moreover, it respects the principles of green chemistry (Anastas and Warner 1998). However, *tert*-butanol was not discarded to evaluate its role in phospholipid and glycerol tolerance during the comparison between crude and refined oils.

### **II.5.2 Crude oil vs refined oil**

Figure II.5-3 compares the yields of butyl ester production during butanolysis of crude and refined HOSO, in the presence or absence of *tert*-butanol as solvent. In solvent free conditions, the rate of butyl ester production was 2.3-fold lower with crude oil than with refined oil as substrate: the initial rate of butyl ester synthesis was calculated at  $198 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  for refined HOSO and  $88 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  for crude HOSO. As a consequence, equilibrium was reached in 28 hours for refined HOSO (97% yield) whereas it was not reached after 48 hours for crude HOSO (79% yield). Watanabe et al. (2002) demonstrated that crude soybean oil did not undergo methanolysis with Novozyme 435 in a solvent-free system, but degummed oil did. It was identified as the consequence of the presence of phospholipids in crude oil.

In contrast, in *tert*-butanol, no difference in activity was obtained whether the HOSO was refined or crude. The presence of *tert*-butanol was therefore thought to improve phospholipid solubility and consequently enable its adsorption onto the biocatalyst to be restricted. Talukder et al. (2009) obtained a 10% lower activity when crude palm oil was used instead of

refined oil during methanolysis in *tert*-butanol. They demonstrated that the higher the phospholipid content, the lower the activity. The crude HOSO used in this study contained 385 mg/kg (i.e. 0.04 % wt) of PL. At similar levels, Talukder et al. (2009) observed a 5% decrease in activity. However, they used higher substrate concentrations (500 mM of oil) and consequently the effect of the medium polarity was less pronounced than in our study.

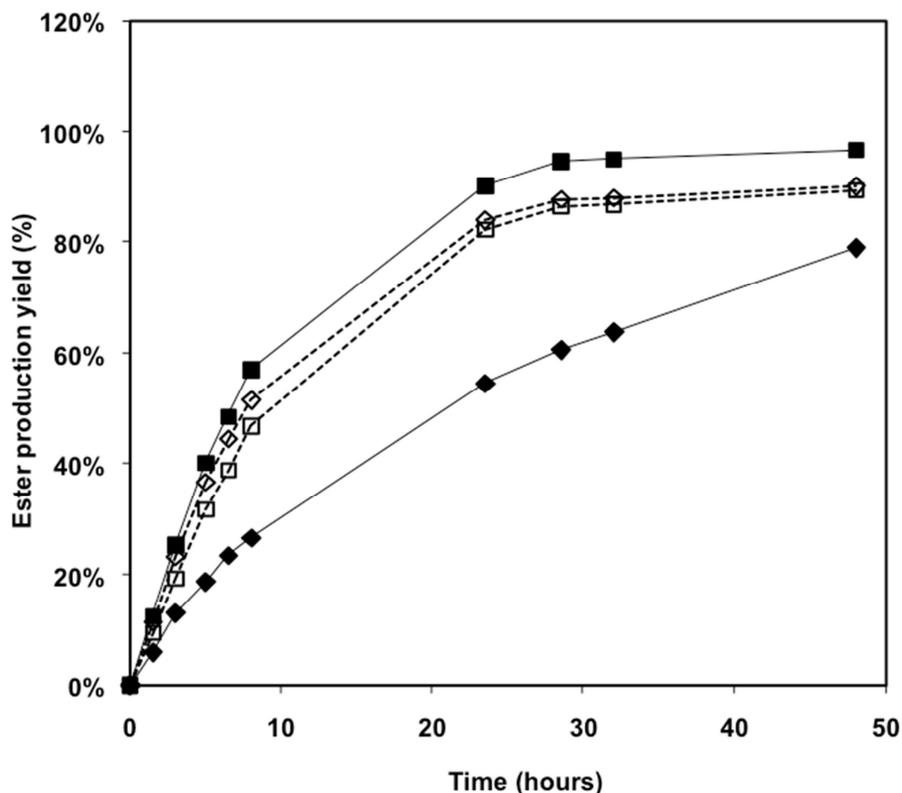


Figure II.5-3: butyl ester yields obtained during transesterification of refined ( $\diamond$ ) and crude ( $\square$ ) high-oleic sunflower oils for production of fatty acid butyl esters with *tert*-butanol (empty signs) or without solvent (filled signs). Reaction conditions: (i) with *tert*-butanol: 250 mM refined or crude oil, 1000 mM butanol, 50 mg Novozyme 435, and reaction volume: 10 ml; (ii) without solvent: 702 mM refined or crude oil, 3510 mM butanol, 50 mg Novozyme 435, and reaction volume: 4 ml.

Therefore, the use of *tert*-butanol appears to be a good strategy to eliminate the non-desirable effects of PL when using crude oils. This would be even more crucial in a continuous PBR where the accumulation would lead to excessive loss of activity.

### **II.5.3 Effect of the butanol/TAG molar ratio in continuous packed bed reactor.**

The ratio between the quantities of alcohol and crude oil is an important factor that has to be taken into account in a transesterification reaction. It has been demonstrated that the optimal molar ratio is dependent on the type of lipase and the type of alcohol (Rodrigues et al. 2008). During transesterification of HOSO, an optimal butanol/TAG molar ratio of 4 was reported (Dossat et al. 2002). Nevertheless, these authors obtained high levels of remaining DAG and MAG, lowering the ester yield. Moreover, they identified butanol as a competitive inhibitor in the reaction. The butanol/HOSO molar ratio should therefore be adapted to optimize the yield of transesterification as well as the level of activity.

The reaction medium composition was analyzed in the PBR outflow at the steady state during the continuous transesterification of solutions containing 200 mM or 500 mM crude HOSO in *tert*-butanol. Figure II.5-4 presents the average yields of TAG, DAG, MAG and Esters, calculated over a period of ten days. Whatever the ratio, no loss of activity was observed during this period, enabling yields to remain constant. The polarity of the medium enables glycerol and PL adsorption to be avoided and consequently, a stable reactor to be obtained.

Whatever the butanol/TAG molar ratio and the initial concentration, TAG were completely consumed, with conversion levels of over 99% (data not shown). Nevertheless, the molar ratio strongly influenced product composition at equilibrium. DAGs and MAGs were poorly converted when butanol was present in stoichiometric proportions with yields of 15.3% and 64% respectively for an initial TAG concentration of 200 mM. Their consumption became enhanced when the initial quantity of butanol was increased. Their respective average yield

fell to 1.9% and to 27.4% for a molar ratio of 4. As a consequence, the butyl ester yield increased from 64.4% for a molar ratio of 3 to 88.1% for a molar ratio of 4.

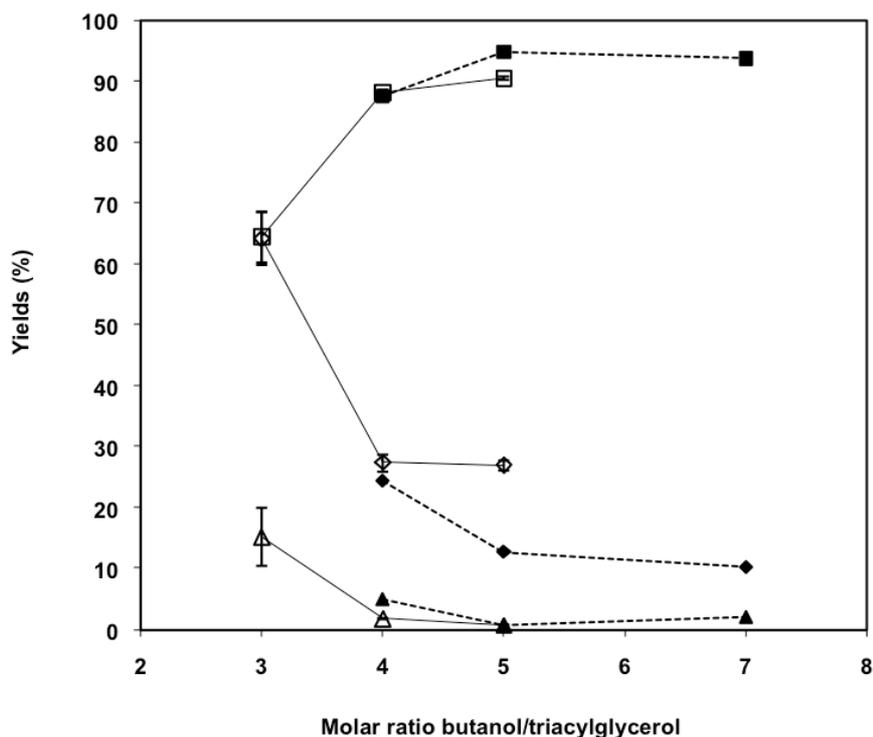


Figure II.5-4 : DAG ( $\Delta$ ), MAG ( $\diamond$ ) and Ester ( $\square$ ) yields measured in the PBR outflow at equilibrium with increasing butanol / oil ratio. Reaction conditions: (i) empty signs and black line: 200 mM crude high oleic sunflower oil, 600 mM, 800 mM, 1000 mM butanol in *tert*-butanol, (ii) filled signs and dotted line: 500 mM crude high-oleic sunflower oil, 2000 mM, 2500 mM and 3500 mM butanol in *tert*-butanol; PBR containing 10 g of Novozyme 435, temperature: 60°C.

At an initial concentration of 200mM, the use of a molar ratio of 5 did not achieve a decrease in the MAG yield (27.0%) whereas it was significantly decreased when a concentration of 500 mM was fed into the reactor. Under these conditions the MAG yield reached 12.9% (initial oil concentration of 500 mM and molar ratio of 5). Consequently, the use of a molar ratio of 5 enabled an increase in ester production, the yield being increased from 87.6% for a molar ratio of 4 to 94.8%.

Higher proportions of butanol did not greatly decrease MAG production, with a yield of 10.4% at a ratio 7 at an initial concentration of 500 mM. Moreover, the use of higher substrate ratios would lead to higher inhibition phenomena due to the alcohol, causing losses in productivity. For these reasons, a butanol/TAG molar ratio of 5 appears to be the best compromise and was adopted for further PBR optimization.

#### **II.5.4 Effect of initial TAG concentration in continuous PBR.**

The quantity of crude oil feeding the reactor determines the global reactor productivity and is at the origin of the economic relevance of the entire process. However, it has a strong influence on the polarity of the medium with numerous consequences such as a different thermodynamic equilibrium, variation of enzymatic activity and different partitions of glycerol and PLs between the medium and the supported enzyme.

The effect of the crude oil concentration feeding the reactor was analyzed with a range of concentrations of 200 mM to 702 mM. The latter concentration corresponds to a solvent-free system. The objective was to determine the maximum flow rate which enables thermodynamic equilibrium to be reached in the continuous plug flow reactor. Above this equilibrium flow rate, the quantities of residual TAG, DAG and MAG are significantly increased. The equilibrium flow rate was determined by increasing the flow rate step by step. The equivalent of five residence times was left between flow rate changes and analysis in order to reach the steady state.

##### **II.5.4.1 Effect of initial TAG concentration on final product mixture.**

TAG conversion and the DAG yield were found constant, at a value of 0.8% and 0.08% respectively, whatever the initial TAG concentration in the reactor feed (data not shown). As presented in Figure II.5-5, the productions of MAG and butyl ester were, on the contrary,

found highly dependent on the initial TAG concentration. MAGs were produced with a stable yield of 26% for initial TAG concentrations ranging from 200 mM to 400 mM. Above this concentration, MAG production fell steadily and they were almost completely transformed (final yield of 0.1%) for initial TAG concentrations of 650mM.

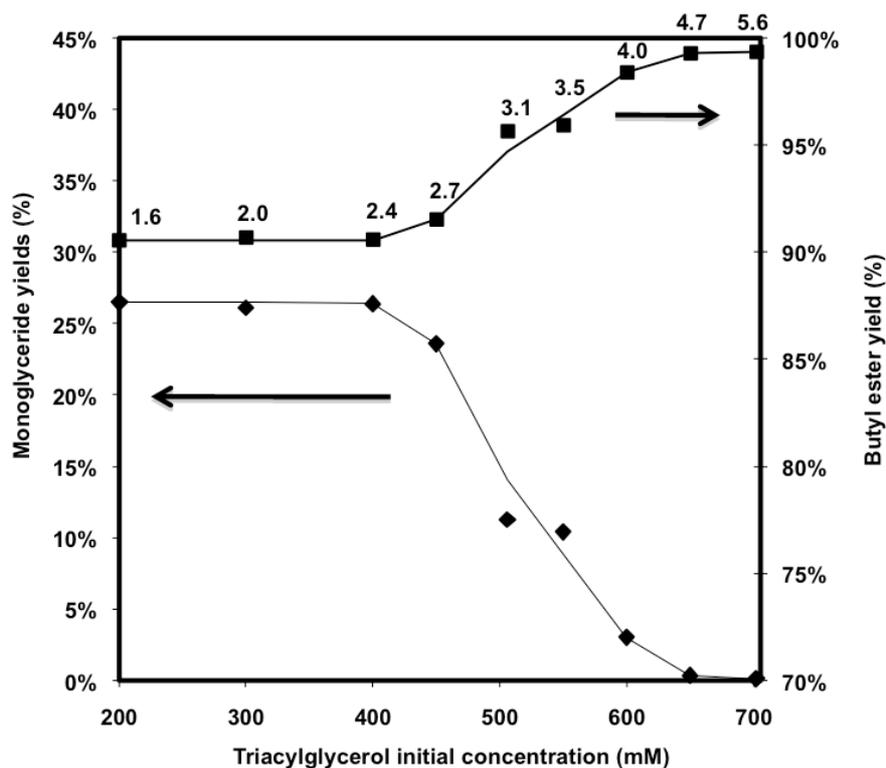


Figure II.5-5 MAG yield (♦ / left axis) and butyl ester yield (■ / right axis) measured in the PBR outflow at equilibrium flow rate and at steady state versus the initial TAG concentration. Point labels represent the mixture polarity Log(P). Operational conditions: butanol / crude high-oleic sunflower oil: 5/1 in *tert*-butanol as solvent, PBR containing 10 g of Novozyme 435, temperature: 60°C.

As the residual DAGs and TAGs were constant whatever the initial concentrations, the production of butyl esters was enhanced inversely to the decrease of MAG production. Butyl ester yields of 91% were obtained for initial concentrations under 400mM. The increase of

initial TAG concentration parallels an enhancement of butyl ester production to reach 99% for initial TAG concentrations of up to 650 mM.

In brief, it can be argued that the higher the TAG concentration, the greater the purity of the butyl esters obtained in the reactor outflow.

This shift in thermodynamic equilibrium observed through the conversion of MAG to esters is thought to arise from the variation of medium polarity when the TAG concentration is increased. This is in agreement with results obtained by Bellot *et al.* (2001) who described the importance of the reaction medium on the equilibrium position: polar molecule synthesis is favored in a polar medium and vice versa.

$\text{Log}P_{\text{medium}}$ , the polarity coefficient of the reaction medium, was computed by means of equation II-5 (Du et al. 2007); the polarity coefficient of each individual component ( $\text{Log}P_i$ ) was computed using Cosmotherm software (Cosmologic, Germany) (Klamt 2005). The  $\text{Log}P$  values are given in figure 5.

$$\text{Log}P_{\text{mixture}} = \sum x_i \text{Log}P_i \quad (\text{Eq. II-5})$$

The presence of MAG is constant up to a  $\text{Log}P$  coefficient of 2.4. Therefore, the MAGs are favored in medium containing *tert*-butanol and presenting a polar character ( $\text{Log}P < 2.4$ ). Up to this polarity, the synthesis of butyl-esters is increasingly favored, in opposition to the production of MAGs.

#### II.5.4.2 Effect of initial TAG concentration on productivity.

TAG concentration greatly influenced the equilibrium flow rate, as presented in Figure II.5-6. The equilibrium flow rate increased from 21 ml.h<sup>-1</sup> for a TAG concentration of 200 mM to a maximum of 30.6 ml.h<sup>-1</sup> for a concentration of 450 mM. In contrast, up to 450 mM, the equilibrium flow rate decreased drastically to 1.5 ml.h<sup>-1</sup> for an initial TAG concentration of 702 mM. Analysis of these results is not trivial because the initial TAG concentration influences (i) the quantity of substrate to be converted, (ii) the reaction rate as a function of

the reaction kinetics equation, (iii) the equilibrium and also (iv) the polarity of the reaction medium which will influence the kinetic parameters (Sandoval et al. 2001).

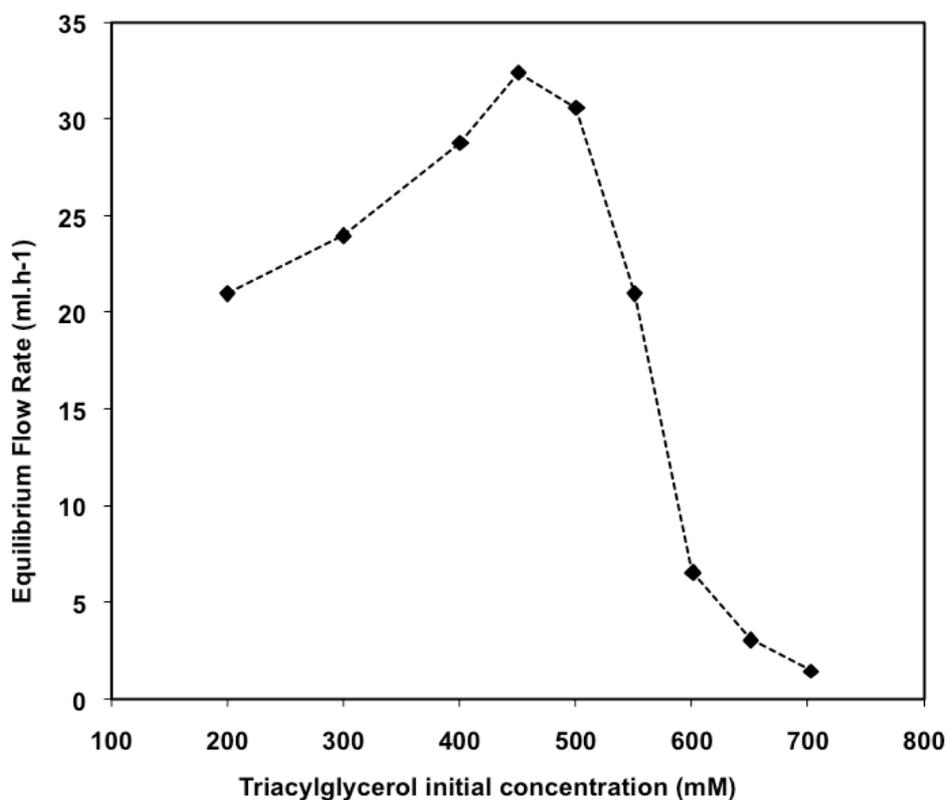


Figure II.5-6 : Flow rates (ml.h<sup>-1</sup>) obtained at equilibrium versus initial TAG concentration (mM). Operational conditions: butanol / crude high-oleic sunflower oil: 5/1 in *tert*-butanol as solvent, PBR containing 10 g of Novozyme 435, temperature: 60°C.

From a kinetic point of view, the problem is complex. To have a better insight, we considered a simple reaction: one substrate gives one product with a reaction rate defined in equation II-6, where  $\alpha$  is the order of the reaction.

$$r = kS^\alpha \quad (\text{Eq. II-6})$$

This simple analysis demonstrates that considering a first reaction order, the equilibrium flow rate does not depend on the initial substrate concentration. Up to this value, flow rate

decreased with high substrate concentrations while the opposite was observed for values lower than 1. On the other hand, in general, an increase of polarity leads to a decrease in enzyme activity.

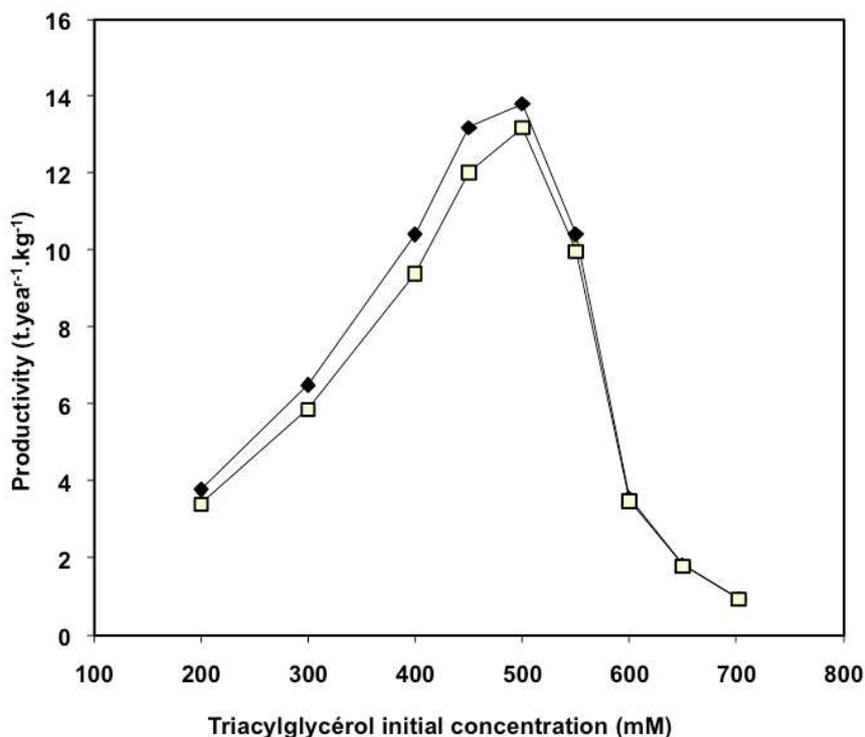


Figure II.5-7 : Productivity of final mixture (◆) and productivity of purified butyl esters (□) versus initial TAG concentrations (mM). Operational conditions: butanol / crude high oleic sunflower oil: 5/1 in *tert*-butanol as solvent, PBR containing 10 g of Novozyme 435, temperature: 60°C.

The PBR productivity was calculated in terms of weight of final product mixture or in terms of weight of pure esters (Figure II.5-7). Indeed, several production strategies can be developed. The first consists in the conservation of the monoglycerides produced in the final product without additional purification. In this case, MAG can confer lubricant and surfactant properties to the mixture (Dossat et al. 2002; Knothe and Steidley 2005). The second strategy consists in the production of pure butyl esters. In this way, a downstream process of ester

purification (distillation, etc.) can be necessary, representing a significant added cost to the product.

The shape of the two productivity curves was found similar with an increase of productivity when the initial TAG concentration was increased from 200 mM to 500 mM. The use of higher TAG concentrations resulted in a drastic decrease in the production capacity due to the decrease of the flow rate. As a consequence, a compromise between productivity and ester purity had to be reached: high productivities correspond to low purity (mixture containing 95.9 mol % of butyl esters) and the highest purity (mixture containing 99.6% mol of butyl esters) is only reached with low productivity.

Consequently, an initial TAG concentration of 500 mM appeared to be a good compromise between ester productivity (13.8 tons of product.year<sup>-1</sup>.kg Novozyme 435<sup>-1</sup>) and ester purity (95.9% mol). In these conditions, *tert*-butanol represents 28% vol. of the reaction medium.

If ester purity higher than 96% is required, one solution could be the use of two plug-flow reactors, separated by an operation unit for glycerol removal. We tested this strategy and succeeded to obtain a butyl-ester yield of 98.8% (MAG yield decreased to 1.1%) and consequently an ester purity of 99.6%. Glycerol separation was performed discontinuously, by evaporation of the solvent and of the residual butanol, and by glycerol decantation.

### **II.5.5 Reactor stability.**

The operational stability of the catalyst in the continuous process was tested in previously optimized conditions ie. an initial TAG concentration of 500 mM, a butanol/TAG molar ratio of 5 and a flow rate of 30.6 ml.h<sup>-1</sup>. After evaporation of solvent and residual butanol and decantation of glycerol, 96.0mol % of FAAE, 0.03mol % of TAG, 0.27mol % of DAG and 3.75mol % of MAG were synthesized on average, with a productivity of 13.8 tons.year<sup>-1</sup>.kg

Novozyme 435<sup>-1</sup>. Finally, a glycerol productivity of 1.2 tons.year<sup>-1</sup>.kg Novozyme 435<sup>-1</sup> was attained during the process.

The system was operated over a period of 50 days without any loss in enzyme activity, with the same average composition in the outflow for the whole period. The results suggest that the lipase can be stable for longer period of time and considering a life-time of one year, the added cost due to lipase to the FAEE mixture is about 8 euro cents per kg, considering that Novozyme 435 is priced at 1100 euros.kg<sup>-1</sup>.

## **II.6 Conclusions**

The use of Novozyme 435 in presence of *tert*-butanol offers a series of advantages for the transesterification of crude HOSO: (i) high level of activity and high yields of conversion are obtained; (ii) the system can be conducted in a continuous process without inhibition or instability due to the presence of phospholipids in crude oils or due to the production of glycerol; (iii) the catalyst does not require regeneration and long-term catalysis is possible. Finally, the use of crude oil containing natural antioxidant will reduce the production price and would confer to the product improved properties appreciated for end-users.

### **Acknowledgements**

Work was financially supported by Syngenta Seeds SAS and the 'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie' (ANRT). The authors would like to thank Peter Winterton of Toulouse University who helped to correct the English version of the manuscript .

## **II.7 References**

- Anastas, P. T. and J. C. Warner** 1998. Green Chemistry Theory and Practice. Oxford University Press, New York.
- Balcão, V. M., A. L. Paiva and F. Xavier Malcata**, 1996. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme. Microb. Technol.* 18(6): 392-416.
- Bellot, J., L. Choisnard, E. Castillo and A. Marty**, 2001. Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification. *Enzyme. Microb. Technol.* 28(4-5): 362-369.
- Colombie, S., R. J. Tweddell, J. S. Condoret and A. Marty**, 1998. Water activity control: a way to improve the efficiency of continuous lipase esterification. *Biotechnol. Bioeng.* 60(3): 362-368.
- Compton, D. L., K. E. Vermillion and J. A. Laszlo**, 2007. Acyl migration kinetics of 2-monoacylglycerols from soybean oil via <sup>1</sup>H NMR. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84(4): 343-348.
- Dossat, V., D. Combes and A. Marty**, 1999. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. *Enzyme. Microb. Technol.* 25(3-5): 194-200.
- Dossat, V., D. Combes and A. Marty**, 2002. Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent-free process. *J. Biotechnol.* 97(2): 117-124.
- Du, W., D. Liu, L. Li and L. Dai**, 2007. Mechanism exploration during lipase-mediated methanolysis of renewable oils for biodiesel production in a tert-butanol system. *Biotechnol. Prog.* 23(5): 1087-1090.
- Du, W., Y. Y. Xu, J. Zeng and D. H. Liu**, 2004. Novozym 435-catalysed transesterification of crude soya bean oils for biodiesel production in a solvent-free medium. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 40(Pt 2): 187.
- Fureby, A. M., C. Virto, P. Adlercreutz and B. Mattiasson**, 1996. Acyl group migrations in 2-monoolein. *Biocatal. Biotrans.* 14(2): 89-111.
- Halling, P. J.**, 1990. Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: predictions of effects on equilibrium position. *Biotechnol. Bioeng.* 35(7): 691-701.
- Hernandez-Martin, E. and C. Otero**, 2008. Enzymatic Re-esterification of Lower Glycerides from Soybean Oil with Conjugated Linoleic Acid (CLA). *J. Agric. Food Chem.* 57(2): 701-708.

- Iso, M., B. Chen, M. Eguchi, T. Kudo and S. Shrestha**, 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 16(1): 53-58.
- Jain, S. and M. P. Sharma**, 2010. Stability of biodiesel and its blends: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(2): 667-678.
- Janseen, A. E. M., A. Van der Padt, H. M. Van Sonsbeek and K. Van't Riet**, 1993. The effect of organic solvents on the equilibrium position of enzymatic acylglycerol synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 41(1): 95-103.
- Klamt, A.** 2005. COSMO-RS: from quantum chemistry to fluid phase thermodynamics and drug design. Elsevier Amsterdam.
- Knothe, G. and K. R. Steidley**, 2005. Lubricity of Components of Biodiesel and Petrodiesel. The Origin of Biodiesel Lubricity†. *Energy Fuels* 19(3): 1192-1200.
- Knothe, G., J. Van Gerpen and J. Krahl** 2005. The biodiesel handbook. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.
- Laszlo, J. A., D. L. Compton and K. E. Vermillion**, 2008. Acyl migration kinetics of vegetable oil 1, 2-diacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85(4): 307-312.
- Marty, A., V. Dossat and J. S. Condoret**, 1997. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds. *Biotechnol. Bioeng.* 56(2): 232-237.
- Medina Gonzalez, Y., P. De Caro, S. Thiebaut-Roux and C. Lacaze-Dufaure**, 2007. Fatty Acid Methyl Esters as Biosolvents of Epoxy Resins: A Physicochemical Study. *J Solution Chem.* 36(4): 437-446.
- Parawira, W.**, 2009. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29(2): 82-93.
- Rao, N., S. Lütz, K. Würges and D. Minör**, 2009. Continuous Biocatalytic Processes. *Organic Process Research & Development* 13(3): 607-613.
- Rodrigues, R. C., G. Volpato, K. Wada and M. A. Z. Ayub**, 2008. Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85(10): 925-930.
- Royon, D., M. Daz, G. Ellenrieder and S. Locatelli**, 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresour. Technol.* 98(3): 648-653.
- Sandoval, G. C., A. Marty and J. S. Condoret**, 2001. Thermodynamic activity-based enzyme kinetics: efficient tool for nonaqueous enzymology. *AIChE* 47(3): 718-726.

**Schörken, U. and P. Kempers**, 2009. Lipid biotechnology: Industrially relevant production processes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111(7): 627-645.

**Shimada, Y., Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda and Y. Tominaga**, 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76(7): 789-793.

**Shimada, Y., Y. Watanabe, A. Sugihara and Y. Tominaga**, 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 17(3-5): 133-142.

**Szczesna Antczak, M., A. Kubiak, T. Antczak and S. Bielecki**, 2009. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy* 34(5): 1185-1194.

**Talukder, M., J. Wu, T. Van Nguyen, N. Fen and Y. Melissa**, 2009. Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 60(3-4): 106-112.

**Warner, K., B. Vick, L. Kleingartner, R. Isaak and K. Doroff** (2003). Composition of sunflower, nusun (mid-oleic sunflower) and high-oleic sunflower oils. <http://www.sunflowernsa.com/uploads/Warner.pdf>: 16-17.

**Watanabe, Y., Y. Shimada, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda and Y. Tominaga**, 2000. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77(4): 355-360.

**Watanabe, Y., Y. Shimada, A. Sugihara and Y. Tominaga**, 2001. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78(7): 703-707.

**Watanabe, Y., Y. Shimada, A. Sugihara and Y. Tominaga**, 2002. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 17(3-5): 151-155.



**III : PUBLICATION N°2 :**

**TRANSESTERIFICATION CONTINUE DES HUILES VEGETALES**

**BRUTES : UNE VOIE POUR AMELIORER LA STABILITE OXYDATIVE**

**DES ESTERS.**

---

---

**Etienne Séverac<sup>a</sup>**, Julien Cescut<sup>a</sup>, Fabrice Turon<sup>b</sup>, Pierre Monsan<sup>a</sup> and Alain Marty<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> 1) Université de Toulouse; INSA,UPS,INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077  
Toulouse, France

2) INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse,  
France

3) CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

<sup>b</sup> Syngenta Seeds, 12 Chemin du hobit, 31790 Saint Sauveur, France

\* Correspondence : Alain Marty, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et  
Procédés, Institut National des Sciences Appliquées, 135 Avenue de Rangueil, 31077  
Toulouse Cedex4, France, Tel : +33 (0)5 61 55 94 39, Fax : +33 (0)5 61 55 94 00, Email :  
alain.marty@insa-toulouse.fr

---

---

Soumis dans **Journal of the American Oil Chemist' Society**.

*(Impact factor: 1,803)*

---

Titre abrégé: III. Transestérification des huiles vierges et stabilité oxydative

---

#### **III.1 Résumé**

L'originalité du procédé optimisé au travers de cet article n°1 réside dans l'utilisation d'huiles vierges comme matière première. Si cela permet d'éviter un processus de raffinage pouvant être coûteux (environ 10% de coûts additionnels) et donc diminuer les coûts globaux de production, le réel bénéfice de cette utilisation est la teneur élevée en composés mineurs des huiles (stérois, tocophérols, phospholipides, autres composés phénoliques etc...). Ces derniers confèrent aux huiles brutes des propriétés de stabilité oxydative naturelle accrues par rapport aux huiles raffinées. Les gains en termes de résistance à l'oxydation dans les esters produits ont été estimés au travers de ce 2<sup>ème</sup> article.

L'emploi des enzymes, de part leur spécificité de substrats et des conditions douces de mise en œuvre, permet d'envisager la préservation des composés mineurs dans un produit final hautement résistant vis à vis du stress oxydatif. Le réacteur enzymatique à lit fixe optimisé dans le chapitre II (Article n°1) a été utilisé pour effectuer la synthèse d'esters butyliques à partir d'huiles brutes et raffinées de différentes sources dans le but d'évaluer l'effet du procédé sur les composés mineurs présents dans ces huiles. Les huiles de tournesol hautement oléique, de colza et d'olive ont été choisies pour leurs teneurs élevées, respectivement, en tocophérols et stérois, en phospholipides et en composés phénoliques. La versatilité du réacteur employé est telle qu'il est susceptible d'accepter des huiles d'origine différente et donc de compositions en acides gras différents sans différence notable de capacité catalytique. Un mélange contenant 96% mol d'esters butyliques a été obtenu quelle que soit l'huile utilisée, les 4% restant étant constitué de monoacylglycérols, de diacylglycérols et de triacylglycérols résiduels.

Le dosage des différents composés antioxydants dans les huiles de départ et les produits de réaction obtenus en sortie de réacteur continu permettent d'évaluer le devenir de chacun au

cours du procédé biocatalytique. Nous montrons que chacun est préservé, seul un effet de dilution de l'ordre de 1,2 est obtenu. Cet effet de dilution est lié au processus réactionnel lui-même. La première conséquence est que ces composés ne s'adsorbent pas sur le support enzymatique ce qui permet d'obtenir un réacteur parfaitement stable, présentant une productivité remarquable de 11 tonnes par an et par kg de Novozyme 435. Cela permet de diluer significativement les coûts en biocatalyseur. Par ailleurs, un taux élevé de phospholipides, connus pour leurs propriétés d'antioxydants synergiques, est retrouvé dans les esters issus d'huile de colza brute alors qu'ils sont absents lorsque l'huile de colza utilisée est raffinée. La teneur de tocophérols et de stérols mesurée dans les esters issus d'huile de tournesol hautement oléique vierge sont 10% et 9% supérieurs à la teneur obtenue dans les esters issus d'huile raffinée. Il en est de même pour les composés phénoliques de l'huile d'olive vierge qui sont conservés dans les esters alors qu'ils sont perdus lors du procédé de raffinage.

La résistance aux stress oxydatifs est estimée par la mesure du temps d'induction sous haute température et sous flux d'oxygène (technique du Rancimat) dans les huiles de départ et les mélanges d'esters obtenus. Les temps d'induction apparaissent inversement proportionnels aux taux d'acides gras poly-insaturés présents dans les huiles et les mélanges d'esters. Les temps de résistance obtenus avec les huiles vierges sont légèrement supérieurs à ceux obtenus avec les huiles raffinées. Des temps d'induction des mélanges d'esters très similaires à ceux obtenus avec les huiles de départ ont été mesurés. Cela montre qu'aucun stress oxydatif particulier n'est engendré par le processus de transestérification continue ; les esters ainsi synthétisés conservent les capacités de résistance de leurs huiles mères. Les esters issus d'huiles vierges, présentant un taux de composés mineurs supérieurs à ceux des huiles raffinées, développent des résistances à l'oxydation supérieures. Les esters synthétisés par

### III. Transestérification des huiles vierges et stabilité oxydative

---

voie enzymatique possèdent ainsi des qualités de stabilité supérieures aux normes éditées pour une utilisation industrielle.

**Mot clés** : Novozyme 435, transestérification, réacteur à lit fixe, esters d'acides gras, huiles vierges, stabilité oxydative

**CONTINUOUS LIPASE-CATALYZED TRANSESTERIFICATION OF  
CRUDE VEGETABLE OILS: A WAY TO IMPROVE OXIDATIVE  
STABILITY OF ESTERS.**

---

**Etienne Séverac<sup>a</sup>**, Julien Cescut<sup>a</sup>, Fabrice Turon<sup>b</sup>, Pierre Monsan<sup>a</sup> and Alain Marty<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> 1) Université de Toulouse; INSA,UPS,INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077  
Toulouse, France

2) INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse,  
France

3) CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

<sup>b</sup> Syngenta Seeds, 12 Chemin du hobit 31790 Saint Sauveur, France

\* Correspondence : Alain Marty, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et  
Procédés, Institut National des Sciences Appliquées, 135 Avenue de Rangueil, 31077  
Toulouse Cedex4, France, Tel : +33 (0)5 61 55 94 39, Fax : +33 (0)5 61 55 94 00, Email :  
alain.marty@insa-toulouse.fr

---

Submitted in **Journal of the American Oil Chemist' Society**.

*(Impact factor: 1,803)*

---

Abbreviated title: Transesterification of crude oils and oxidative stability

#### **III.2 Abstract**

Fatty acid alkyl esters are synthesized by transesterification of vegetable oils for various industrial applications: bio-fuels, bio-lubricants, etc. Susceptibility to oxidation is one of the main drawbacks to the use of fatty acid alkyl esters. One way to improve their resistance to oxidation is to use an enzymatic approach converting crude oils (instead of refined oils) containing higher levels of natural antioxidants. A continuous packed bed reactor (PBR) filled with the lipase Novozyme 435 and using *tert*-butanol as solvent was able to produce mixtures containing 96 mol% of butyl esters from crude and refined high-oleic sunflower oils, rapeseed oils or olive oils with a high productivity of 11 tons of ester mixture produced per year and per kg of Novozyme 435. Phospholipids as well as sterols, tocopherols and other phenolic compounds were preserved with this enzymatic approach. These compounds were completely evacuated from the reactor, avoiding their adsorption onto the biocatalyst. In consequence, the continuous enzymatic reactor was perfectly stable. Continuous lipase-catalysed transesterification at mild temperature did not generate oxidative stress. The esters obtained from the crude oils presented a significantly higher stability to oxidation (about two times) compared to esters obtained from refined oils. These fatty acid alkyl esters, which largely respect the oxidation norms, would be greatly appreciated by industry.

Key words: Novozyme 435, transestérification, packed bed reactor, fatty acid alkyl esters, crude oils, oxidative stability.

### **III.3 Introduction.**

It is now generally acknowledged that fossil resource reserves are finite. Moreover, the intensive use of this non-renewable carbon is partly responsible for the global warming correlated with the emission of greenhouse gases. The development of renewable substitution resources and alternative methods of production has become a necessity. Fatty acid alkyl esters (FAAE) present a low toxicity, a high biodegradability and are renewable, thus reducing the carbon balance<sup>[1]</sup>. Their physico-chemical properties depend on both the nature of the feedstock (fatty acids) and on the alkyl ester moiety. FAAE are involved in a wide range of industrial applications: bio-fuels, bio-lubricants, bio-solvents, hydraulic and drilling fluids, cosmetics etc.<sup>[2, 3]</sup>.

The susceptibility to oxidation due to ambient air exposure is one of the major technical hurdles facing the use of FAAE. Fatty acid chain oxidation, which results in the production of peroxides and hydroperoxides, harmful for FAAE applications, is a complex process that proceeds by a variety of mechanisms. Oxidation of fatty compounds has been discussed extensively in the literature<sup>[4, 5]</sup>. Since oxidation affects the properties of FAAE, the issue has been addressed in certain specifications in standards. For example, specifications of biodiesel oxidative stability are included in European standards EN 14214 or in American standards ASTM (ASTM = American Society for Testing and Materials) D6751, both using the method EN 14112 for measurement<sup>[2, 6]</sup>. Minimum induction times of 6 hours and 3 hours respectively at 110°C in a Rancimat apparatus are required in the two standards<sup>[2, 6]</sup>. The oxidative stability of fatty compounds is highly dependant in the degree of unsaturation of the fatty acids. Nevertheless, many other factors can influence the oxidation of FAAE<sup>[6, 7]</sup>. While exposure to high temperatures, the action of light or extraneous material (metals, etc.) can favour oxidation, the presence of natural or synthetic antioxidants can prevent oxidation<sup>[2, 7, 8]</sup>.

Crude vegetable oils, obtained directly by crushing and/or solvent extraction without refining, exhibit higher oxidative stability than refined oils<sup>[9]</sup>. This is the consequence of a higher content in minor components such as tocopherols, sterols or phenolic compounds, which are described as natural antioxidants<sup>[4, 5]</sup> protecting the oils against degradation. Chemical and physical refinings result in a decrease of tocopherol and sterol levels<sup>[10]</sup>. The phospholipids present in crude oils and eliminated during the refining process are reported to have antioxidant activities, in synergy with tocopherols<sup>[4, 11]</sup>. Thus, one means of improving the oxidative stability of FAAE would be to use crude oils instead of refined oils as raw material, in order to preserve a large proportion of the antioxidants naturally present. Furthermore, from an economic point of view, avoiding the costly refining process (about 100 €.ton<sup>-1</sup>; unpublished data, syngenta intelligence) is attractive, the price of oil sources directly affecting the cost of FAAE production.

Standard synthesis of FAAE from oil uses chemical alkali- or acid-catalyzed transesterification leading to high reaction rates and high conversions. Nevertheless, these chemical approaches have some unavoidable drawbacks<sup>[12]</sup>. The reaction temperatures are often elevated and thus, the processes are energy costly<sup>[12]</sup>. The recovery of glycerol, the reaction by-product is often unfeasible and a large amount of waste water from catalysts has to be treated<sup>[12]</sup>. The presence of relatively high amounts of free fatty acids in the crude oils can be problematic because alkaline catalysis then forms undesirable soaps<sup>[13]</sup>. Finally, the drastic conditions of chemical catalysis can be a source of degradation or elimination of components acting as antioxidants in oils.

In the last few years, transesterification of triacylglycerols from oils using lipase (formally called, triacylglycerol acylhydrolases, EC.3.1.1.3) under mild conditions for FAAE production has emerged<sup>[12]</sup>. The suitability of lipase catalysis in batch transesterification has

been widely reported, demonstrating the possibility of recycling the enzyme in a batch system with or without solvent<sup>[12]</sup>. Plug flow reactors were also successfully developed<sup>[12]</sup>.

Nevertheless, in spite of the interest in enzymatic catalysis, industrial processes involving lipase are relatively scarce and limited. The main drawback regarding enzymatic processes is the relatively high cost of the biocatalyst: the development of stable continuous processes is required in order to lower the influence the enzyme cost per kilogram of product<sup>[14, 15]</sup>. In this framework, the enzyme has to remain very stable for several weeks or even months without activity loss. One of the crucial points is the control of the partition of the polar compounds between the reaction medium and the enzyme support<sup>[16, 17]</sup>. Several of these polar compounds have been identified as potentially responsible for process instability during transesterification reactions: (i) in solvent-free reactions or in the presence of some hydrophobic solvents, glycerol has been found to be adsorbed onto the surface of the immobilized lipase shortening their operational lifetime<sup>[18]</sup>; (ii) unrefined oil did not undergo methanolysis under solvent-free conditions<sup>[19, 20]</sup>: this was identified as the consequence of the presence of phospholipids in the crude oil<sup>[19, 20]</sup>; (iii) other polar components (such as phenolic compounds) are susceptible to interfere with the alcoholysis of crude oils<sup>[21]</sup>.

Nevertheless, these adsorption phenomena depend on the polarity of both the solvent and the support. Solvents with medium polarity like *tert*-butanol dissolve both polar and non-polar compounds. Several works have shown that these solvents can eliminate the inhibition brought about by glycerol production<sup>[22]</sup> and can reduce inhibition due to PLs<sup>[19, 21]</sup>. In a previous work<sup>[23]</sup>, we described an efficient and stable process for the butanolysis of crude high-oleic sunflower oil using Novozyme 435 as biocatalyst and *tert*-butanol as solvent. We report here the effects of the continuous transesterification on the fate of some of the minor components (PLs, tocopherols, sterols and other phenolic compounds) from several crude vegetable oils: crude high-oleic sunflower oil (HOSO), crude rapeseed oils (RSO) and crude

olive oil (OO). The benefits of using crude oils in terms of oxidative stability was then evaluated with reference to their corresponding refined oils

### III.4 Materials and Methods.

#### III.4.1 Materials

Crude high-oleic sunflower oil was supplied by Syngenta Seeds (Toulouse, France) High-oleic sunflower oil aqueous refining was performed by ITERG (Pessac, France). Crude and refined rapeseed oils were a generous gift from Lesieur (Asnières-sur-Seine, France) Crude and refined olive oils were purchased from Olvea (Saint Léonard, France). The fatty acid composition of the oils is given in Table I.2-1. Immobilized lipase B from *Candida antarctica*, commercially called Novozyme 435, was a generous gift from Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). Folin Cicalteau reagent was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of the highest purity and were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium).

**Table III.4-1: Fatty acid compositions of the oils used in this study. HOSO: High-Oleic Sunflower Oil, RSO: Rapeseed Oil, OO: Olive Oil, tr: traces (<0.1%)**

Fatty Acids	HOSO		RSO		OO	
	crude	refined	crude	refined	crude	refined
C16:0	2.9%	2.8%	4.9%	4.8%	10.5%	10.5%
C16:1	2.9%	2.8%	tr	tr	0.6%	0.9%
C18:0	3.7%	3.7%	1.6%	1.6%	3.5%	3.2%
C18:1	76.7%	77.5%	61.3%	61.0%	80.3%	79.1%
C18:2	13.4%	12.8%	21.6%	22.0%	4.6%	5.7%
C18:3	0.4%	0.4%	9.4%	9.3%	0.4%	0.5%
C20:1	tr	tr	1.2%	1.2%	tr	tr
Σ saturated	6.6%	6.4%	6.5%	6.4%	14.0%	13.7%
Σ mono-unsaturated	79.6%	80.3%	62.6%	67.4%	80.9%	80.0%
Σ poly-unsaturated	13.9%	13.3%	31.0%	31.4%	5.1%	6.2%

#### **III.4.2 Continuous transesterification in a packed bed reactor.**

The fixed-bed reactor consisted in a thermostated (60°C) glass column (10 mm diameter) containing 10 g of Novozyme 435 (bed length: 11 cm g<sup>-1</sup>). The reaction medium containing 500 mM oil and 2.5 M butanol (molar alcohol/oil ratio of 5) with *tert*-butanol as solvent was continuously pumped using an ISO-3100SD Isocratic Pump (Dionex, USA) into the packed bed of Novozyme 435 at a flow rate of 0.4 ml.min<sup>-1</sup>. At the outlet of the reaction vessel, samples were collected and analyzed. FAAE was recovered after solvent removal in a Buchi rotary evaporator under vacuum (15 mbar) and 60°C. The glycerol produced during the reaction was removed using a separating funnel.

#### **III.4.3 HPLC analysis.**

The product and residual reactant concentrations were analyzed using a Dionex Ultimate 3000 HPLC equipped with a 380-LC Evaporative Light Scattering Detector, (Varian, USA) and a reverse-phase analytical Prontosyl C30 column (ICS, France) (250 mm × 4 mm × 5 μm). The nebulisation and evaporation temperatures were kept at 35°C and 40°C respectively. The nitrogen flow-rate was fixed at 1 l.min<sup>-1</sup>.

A 40-min ternary gradient with two linear gradient steps was employed: reservoir A contained pure water, reservoir B contained acetonitrile and reservoir C contained 2-propanol–hexane (5:4, v/v). Gradients were as follows: 30% A+70% B in 0 min, 100% B in 15 min, 50% B+50% C in 30 min, followed by isocratic elution with 50% B+50% C for the last 10 min. The flow rate was 1 ml.min<sup>-1</sup> and oven temperature set at 40°C.

#### **III.4.4 Quantification of fatty acids in oils.**

The fatty acids present in the oils were methylated into fatty acid methyl esters (FAME) using trimethyl sulfonium hydroxide (TMSH, 0.2 M in methanol, Macherey-Nagel, Germany). GC

analysis was carried out on a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph equipped with a 50 m × 250 µm × 25 µm WCOT fused silica column with the polar bonded phase CP-Select CB for FAME (Varian) and a flame ionization detector with Chromeleon® (Dionex) acquisition software, under the following conditions: carrier gas N<sub>2</sub> flow 50 mL.min<sup>-1</sup> oven temperature 50-75 °C at 9 °C.min<sup>-1</sup>, 75-140 °C at 13 °C.min<sup>-1</sup>, 140-180 °C.min<sup>-1</sup> at 1.5 °C.min<sup>-1</sup> and finally 180-240 °C at 4.5 °C.min<sup>-1</sup>, injector temperature 140 °C, detector temperature 250 °C with 40 mL.min<sup>-1</sup> H<sub>2</sub> flow and 450 mL.min<sup>-1</sup> air flow. Identification and quantification of methyl esters were based on the comparison of retention times and peak areas of serial dilutions of commercial standards. Internal standards were C9:0 for short carbon chain length fatty acids and C19:0 for medium length chains.

#### **III.4.5 Minor component and oxidative stability analysis.**

Analysis of tocopherols, sterols and phospholipids in crude and refined oils, and in esters synthesized from crude and refined oils were performed by ITERG (Pessac, France). The tocopherol content was determined according to standard NF EN ISO 9936<sup>[24]</sup>. Sterol content was determined according to standard NF EN ISO 12228<sup>[25]</sup>. Phospholipid content was determined according to standard NF ISO 10540-1 for high contents<sup>[26]</sup> and standard NF ISO 10540-2 for low contents<sup>[27]</sup>.

The concentration of total polyphenol in refined and crude OO and FAAE were estimated according to a previously reported procedure<sup>[28]</sup>. One-gram samples were extracted 3 times with 2 ml of methanol. Methanol was evaporated under a flow of nitrogen. Extracts were washed twice with 3 ml of hexane and evaporated under a flow of nitrogen before dilution with 1 ml of methanol. 0.1 ml of washed extract was diluted with 6 ml H<sub>2</sub>O and 0.5 ml of Folin Cicalteau reagent. After 1 minute, 2 ml of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15% solution was added and the solution made up to 10 ml with distilled water. Absorbance was measured at 700 nm using a

VersaMax tunable microplate reader apparatus (Molecular Devices, Rennes, France). Calibration was done using caffeic acid standard solutions (0-1 mg.ml<sup>-1</sup>).

Oxidative stability analysis was performed by ITERG (Pessac, France) using a Rancimat model 743 from Metrohm (Villebon Courtaboeuf, France). Measurements were according to standards NF ISO 6886 (98°C, 20 l.h<sup>-1</sup>, 3 g samples)<sup>[29]</sup> and NF EN14112 (110°C, 10 l.h<sup>-1</sup>, 3 g samples)<sup>[30]</sup>.

## **III.5 Results and Discussion.**

### **III.5.1 Production of FAAE from crude and refined oils.**

In a previous work<sup>[23]</sup>, we reported the process optimization for efficient continuous transesterification of crude and refined high-oleic sunflower oil with butanol in a plug flow reactor. Novozyme 435 was chosen as catalyst for its non regio-specific characteristics, i.e. the ability to completely convert the triglycerides of oil into FAAE. A molar ratio between alcohol and oil of 5 was chosen in order to maximise the conversion into ester, thus minimizing the level of remaining monoacylglycerol (MAG), diacylglycerol (DAG) and triacylglycerol (TAG). *Tert*-butanol was used as a solvent to obtain reactor stability week after week thanks to minimization of the adsorption of phospholipids from crude high-oleic sunflower and of the adsorption of the produced glycerol. The best ester purity (96%) and productivity (13.8 tons of ester mixture produced per year and per kg of lipase) were obtained with an initial oil concentration of 500 mM. Process stability was tested over a period of 50 days without encountering any loss of activity, proving the viability of the process.

Unrefined vegetable oils containing natural antioxidants are usually found to have improved oxidative stability compared to refined oils<sup>[29]</sup>. Natural antioxidants have also been deliberately added to FAAE to improve their oxidative stability<sup>[31]</sup>. The type and amount of natural antioxidants in oil depend on the oil source and the cultivar. It is then of interest to

compare the properties of FAAE synthesised from crude and refined oils of different types presenting different predominant sources of antioxidant. Therefore, FAAE from crude and refined high oleic sunflower oils (HOSO), rapeseed oils (RSO) and olive oils (OO) were produced by this continuous PBR.

The feeding flow rate was set at 24 ml.h<sup>-1</sup> in order to reach the equilibrium whatever the oil used in the transesterification process during 72 hours. No significant differences were observed in the resulting mixtures of butyl esters with the different oil sources (data not shown). Mixtures containing 96.0 mol % of FAAE, 0.03 mol % of TAG, 0.3 mol % of DAG and 3.8 mol % of MAG, after solvent and butanol evaporation and glycerol separation, were collected in the PBR outflow, irrespective of the oil used as substrate. Whatever the oils, no decrease in activity was observed during the 72 hours of operation. It can be concluded that the reaction is able to rid all the species out of the reactor. In other word no adsorption detrimental to the enzyme activity was observed. In these conditions, high ester productivities of 11 tons per year and per kg of Novozyme 435 were reached.

#### **III.5.2 Influence of transesterification process on phospholipid content.**

Phospholipids (PLs) are important components of crude oils and are almost completely removed during refining. They represent the main species removed during refining. They present antioxidant properties, particularly those with free amino groups (phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine). The main mechanism of the antioxidant phenomenon is due to a synergistic effect between PLs and tocopherols<sup>[11, 32]</sup>. The preservation of high levels of PLs in ester mixtures has a positive effect on oxidative stabilisation. Moreover, the amphiphilic properties of PLs give to the FAAE, surfactant properties that can be useful in some industrial applications.

Because crude RSO contains a higher quantity of PLs compared to the two other oils (HOSO and OO), it was used to analyse the fate of PLs after continuous transesterification with Novozyme 435. Phosphorus content was measured in oil and synthesized ester mixtures (after alcohol evaporation and glycerol separation) according norm NF ISO 10540-1 for high contents<sup>[26]</sup> and the norm NF ISO 10540-2 for low contents<sup>[27]</sup>. The PL concentrations were deduced using the classical conversion factor of 30<sup>[33]</sup>. The results are presented in Table III.5-1.

**Table III.5-1: Phosphorus concentrations and calculated phospholipid concentrations in crude RSO (rapeseed oil) and butyl-ester mixtures.**

	Phosphorus content (mg/kg)	Phospholipid content (mg/kg)
Crude RSO	122	3660
Crude RSO Esters	98	2940

The dilution factor brought about by the transesterification process was calculated at a value of 1.18. The ratio between the PL concentrations in crude RSO and in ester mixtures obtained from crude RSO was 1.24, i.e. close to the factor of dilution caused by the reaction. It was concluded that PLs were preserved during the catalysis process. Nevertheless, the form under which we recovered the phospholipids remained unknown. Novozyme 435 has already been reported as being non-active for hydrolysis of lecithins<sup>[34]</sup> but is able to catalyze transesterification reactions with substituents in position *sn1* of PLs<sup>[35, 36]</sup>. If the transesterification of PLs was complete, two ester molecules and a lyso-phospholipid molecule would be produced. This last one would be, in this case, recovered in the glycerol

phase. In the present study, the phosphorus was entirely recovered in the ester mixtures (oily phase). This would indicate that PLs remains esterified on position sn2 and/or sn1.

The chemical structure of PLs with their large polar head composed of a phosphate residue esterified with a polar compound (choline, serine, ethanolamine, etc.) confers an amphilic and polar character to the PLs. Therefore, in a non-polar medium (like free solvent system or systems containing apolar organic solvent), they are able to adsorb to the Novozyme 435 support<sup>[19, 21]</sup> leading to a decrease of the lipase activity and even lowering stability during repeated reactions. It can be assumed that the PLs create a polar layer around the biocatalyst limiting the diffusion of non-polar compounds from the reaction medium to the enzyme. This hypothesis has already been proposed for water in the esterification reaction in *n*-hexane<sup>[17]</sup> and for glycerol produced during the transesterification reaction<sup>[18]</sup>.

The accumulation of polar compounds in the reactor can diminish the lipase activity, and their evacuation from the reactor is needed in order to maintain a high-efficient catalysis<sup>[16, 18]</sup>. No loss of activity was observed during transesterification of crude RSO during 3 days. Moreover, a high PL concentration in the ester mixture, close to the value of dilution, would suggest that no adsorption of PL occurred during the catalysis. The use of a solvent of medium polarity (*tert*-butanol) would insure perfect evacuation of the PLs from the reactor. The good stability of the transesterification reaction in the PBR is thus guaranteed.

#### **III.5.3 Influence of transesterification process on tocopherol and sterol contents.**

The variation of the tocopherol and sterol concentrations during enzymatic transesterification was estimated by the analysis of a number of samples from an aqueous HOSO refining plant (ITERG, Pessac, France) and of the FAAE produced from them.

Tocopherols are the main natural antioxidants in FAAE mixtures synthesized from vegetable oils<sup>[31, 37]</sup>. Their antioxidant activity is related to their resonant structure and the antioxidant efficiency is ordered as follows:  $\delta$ - >  $\gamma$ - and >  $\alpha$ -tocopherols. Their antioxidant efficiency is dependent on their concentrations<sup>[31]</sup>. A number of plant sterols, especially  $\Delta^5$ - and  $\Delta^7$ -avenasterol have been reported as acting as antioxidants at elevated temperatures<sup>[4]</sup> while sterols such as ergosterol are effective in the protection of oils against thermal polymerisation<sup>[38]</sup>. The antioxidant and anti-polymerisation properties of sterols are related to the presence of ethylene groups in the sterol side-chains and their degree of unsaturation<sup>[38, 39]</sup>. The processing of rich raw materials (crude oils vs refined oils) and the preservation of high levels of tocopherols and sterols during transesterification reactions is thus a way to improve the stability of the FAAE produced.

The tocopherols in crude HOSO are mainly  $\alpha$ -tocopherols with a concentration of 579 mg/kg (94% of the total tocopherols) and  $\beta$ -tocopherol with a concentration of 31 mg/kg (5% of the total tocopherols). The variation of total tocopherol concentrations in HOSO and FAAE at different stages of a refining process was measured and is represented in Figure III.5-1. Total tocopherols decreased slightly during the refining process as already reported<sup>[10]</sup>. A loss of ~20% in their total concentration was obtained between crude and refined HOSO during the refining process.

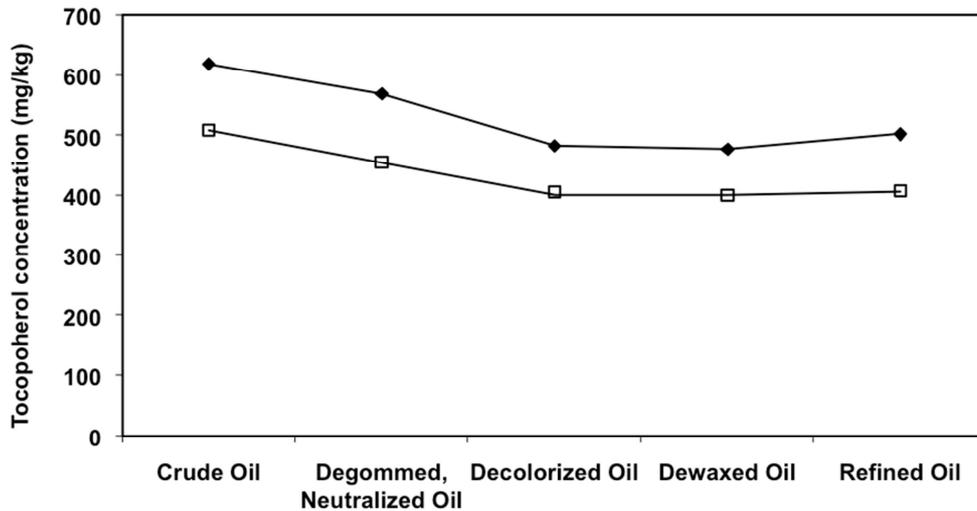


Figure III.5-1: Total tocopherol concentration (mg/kg) in high-oleic sunflower oil (◆) and butyl ester mixtures (□), at different stages of the aqueous refining process. Reaction conditions: Packed bed reactor containing 10g of Novozyme 435, flow rate: 24.ml.h<sup>-1</sup>, temperature: 60°C.

Taking into account the dilution factor of tocopherol due to the reaction (1.2), it can be concluded that tocopherols are perfectly preserved during the transesterification process whatever the initial quality of HOSO.

Bostyn et al. (2008)<sup>[40]</sup> determined that  $\alpha$ -tocopherol naturally are deteriorated at a rate of 0.6 to 36 ppm.h<sup>-1</sup> at temperatures ranging from 50°C to 150°C. The mild temperature conditions i.e. 60°C applied to the continuous enzymatic catalysis in the PBR and the residence time defined for optimal conditions (about 0.4 hours) lead to low degradation of the tocopherols. The individual tocopherols were measured in crude and refined HOSO and butyl-ester mixtures produced from them. The concentrations are presented in Table III.5-2. Because the contents were not differently affected by the refining process, it can be considered that all the tocopherols are preserved during the enzymatic catalysis in the PBR. The tocopherol content was 19.8% higher in the ester mixture synthesized from crude HOSO than the one produced from refined oil.

### III. Transestérification des huiles vierges et stabilité oxydative

**Table III.5-2: Individual tocopherol/tocotrienol concentrations (mg/kg) in crude and refined HOSO (High-Oleic Sunflower Oil) and butyl esters produced from them.**

	Refined HOSO	Esters from Refined HOSO	Crude HOSO	Esters from Crude HOSO
<b>Tocopherols (mg/kg)</b>				
α	463	367	579	478
β	33	34	31	25
γ	7	7	7	6
δ	>2	<2	2	<2
<b>Tocotrienols (mg/kg)</b>				
α	<2	<2	<2	<2
β	<2	<2	<2	<2
γ	<2	<2	<2	<2
δ	<2	<2	<2	<2
<b>Total (mg/kg)</b>	<b>503 (± 75)</b>	<b>408 (± 76)</b>	<b>619 (± 93)</b>	<b>509 (± 76)</b>

The evolution of total sterol concentrations in HOSO and FAAE at different stages of the refining process is represented in Figure III.5-2. The sterols were slightly decreased during the refining process essentially in the first stage of refining. A 9% loss was attained after whole refining process. No loss of total sterols was observed during the transesterification process. The observed decrease is the result of the dilution caused by the reaction.

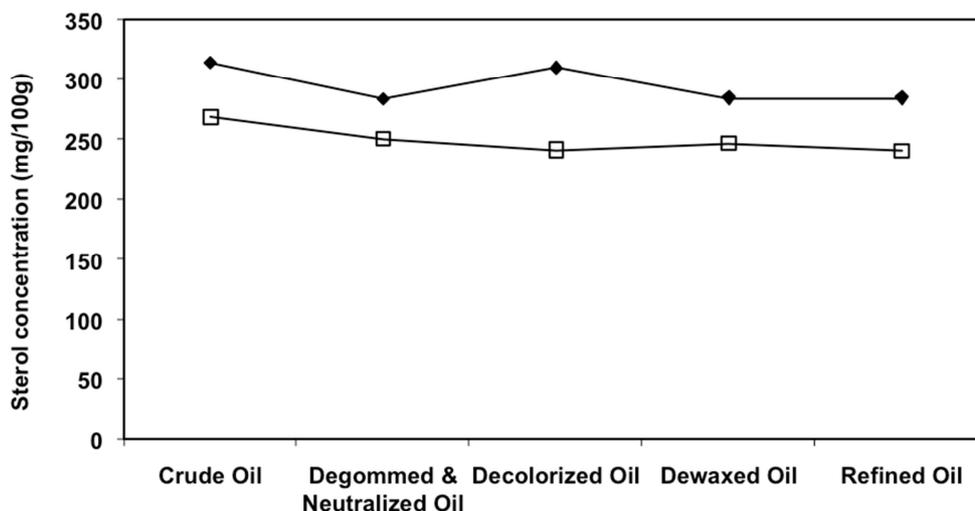


Figure III.5-2: Sterols ( $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) contained in high-oleic sunflower oil ( $\blacklozenge$ ) and butyl ester mixtures ( $\square$ ), at different stages of the aqueous refining process. Reaction conditions: Packed bed reactor containing 10g of Novozyme 435, flow rate:  $24.\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$ , temperature:  $60^{\circ}\text{C}$ .

The individual sterols were identified in crude and refined HOSO and in ester mixtures produced from these oils. The relative proportions are presented in Table III.5-3. Crude HOSO contained mainly  $\beta$ -sitosterol (58.8% of the total sterols), campesterol (11.7%), stigmasterol (9.5%)  $\Delta 7$ -stigmasterol (9.2%) and  $\Delta 7$ -avenasterol (3.2%). The proportion of individual sterols remained unchanged in the ester mixtures. Consequently, it appears that the sterols are preserved during the lipase-catalyzed transesterification process. The amount of sterol in the ester mixture obtained from crude HOSO was 11.6% higher than in the mixture obtained from refined HOSO.

### III. Transestérification des huiles vierges et stabilité oxydative

**Table III.5-3: Individual sterol proportions (%) in crude and refined HOSO (high-oleic sunflower oils) and butyl esters produced from them.**

Sterols	Refined HOSO	Esters from Refined HOSO	Crude HOSO	Esters from Crude HOSO
Cholesterol	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%
Brassicasterol	0.3%	0.3%	0.4%	0.4%
24 MethylCholesterol	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%
Campesterol	11.4%	11.3%	11.7%	11.6%
Campestanol	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%
Stigmasterol	9.0%	9.0%	9.5%	9.4%
$\Delta 7$ Campesterol	3.1%	3.2%	2.5%	2.6%
$\Delta 5,23$ Stigmastadienol + Clerosterol	0.9%	1.1%	0.8%	1.0%
$\beta$ -Sitosterol	58.5%	58.3%	58.8%	58.5%
Stigmastanol	0.5%	0.5%	0.3%	0.3%
$\Delta 5$ Avenasterol	1.8%	1.8%	2.6%	2.6%
$\Delta 5,24$ Stigmastadienol	1.5%	1.4%	0.6%	0.7%
$\Delta 7$ Stigmasterol	9.6%	9.8%	9.2%	9.3%
$\Delta 7$ Avenasterol	2.9%	2.7%	3.2%	3.1%
Non identified	<0.1%	<0.1%	0.1%	<0.1
Total Sterols (mg/100g)	286.0	241	314.0	269

#### **III.5.4 Influence of transesterification process on phenolic compound content.**

Phenolic compounds, other than tocopherols, contained in vegetable oils such as lignans, hydroxy-cinnamic acids, etc. are recognized as strong antioxidants. They are, for example, responsible for the outstanding oxidative stability of sesame and olive oils<sup>[4]</sup>. Esters of polyphenolic acids have been tested to improve the stability of methyl esters (biodiesel)<sup>[41]</sup>.

The phenolic compounds are part of the polar fraction of oils. Consequently, like other polar compounds (PLs and glycerol)<sup>[21]</sup>, they are susceptible to be adsorbed onto the immobilized lipase, leading to the above mentioned problems during catalysis, . Their evacuation from the reactor thus helps ensure catalytic stability. It is therefore useful to estimate the variations in the concentrations of these phenolic compounds during the continuous enzymatic process of

transesterification, either for reactor stability issues or in order to conserve their strong antioxidant properties in the final FAAE produced.

Olive oil, one of the richest oils in phenolic compounds, was chosen for this estimation. Concentrations of phenolic compound, expressed as mg of caffeic acid equivalents per ml, in crude and refined OO and in the corresponding FAAE are presented in Table III.5-4.

**Table III.5-4: Phenolic compound content in crude and refined olive oils (OO) and fatty acid alkyl esters (FAAE), expressed as g equivalents caffeic acid per L.**

	g Eq. Caffeic Acid.l <sup>-1</sup>	
	Oil	FAAE
Crude olive oil	0.48	0.43
Refined olive oil	0.19	0.19

The OO refining process significantly reduced the amount of phenolic compounds, with a 60.2% drop. It can be assumed that phenolic compounds were not lost during the enzymatic reaction, either by degradation or by accumulation in the reactor, the observed decrease (factor 1.18) being due to the dilution induced by the reaction.

### **III.5.5 Oxidative stability of FAAE.**

The Rancimat method provides an accelerated estimation of resistance to oxidation of oils and ester mixtures. The method is based on the fact that, at the end of the induction time, volatile compounds are formed in oxidized oils or fats. The oxidation is induced by constant aeration of a sample heated to a constant temperature. The volatile products are collected in water and their levels are measured through the variation of electric conductivity induced by their

dissolution. During oxidation, the conductivity of the water drops indicating the end of the induction period.

Standard NF EN 14112 specifies that 3g samples have to be analyzed at 110°C with an air flow of 10 L.h<sup>-1</sup>. However, these parameters do not approximate the conditions likely to be encountered during industrial applications or during typical storage of the FAAE. Under the conditions of this standardized test, unsaturated compounds generally undergo oxidative degradation in a relative short period of time<sup>[42]</sup>. Short induction periods can make it harder to compare the oxidative stability of crude and refined oils and FAAE and can underestimate the influence of natural antioxidants. Therefore, standard NF ISO 6886 proposing conditions of analysis with an air flow rate of 20 L.h<sup>-1</sup> but a lower temperature (98°C) was used in addition to standard NF EN 14112 (Table III.5-5). This assumption was observed in our experiments where induction periods obtained with norm NF EN 14112 were between 2 and 4 time shorter than norm NF ISO 6886.

As expected, the oxidative stability of the oils investigated in this study was correlated to their fatty acid composition<sup>[2, 6, 42]</sup>. The longest induction times were obtained for HOSO and OO (crude or refined), which are mainly composed of monounsaturated oleic acid. RSO, containing higher quantities of poly-unsaturated fatty acids, presented induction periods less than a third as long.

The differences between induction times obtained with crude and refined HOSO and RSO were under the level of the method uncertainty (15%). Nevertheless, the tendencies would suggest a higher stability with the unrefined oils. The difference was more pronounced for

### III. Transestérification des huiles vierges et stabilité oxydative

OO where the induction period was two or three time longer for unrefined oil with standards NF EN 14112 and NF ISO 6886 respectively.

The induction times measured with FAAE followed the same profile as that of oils i.e. oils HSO and OO oils showed greater resistance to oxidation than RSO. The differences of induction time between FAAE obtained with crude and refined oil were significantly different. With norm NF ISO 6886, the resistance to oxidation was 65%, 96% and 101% higher when crude HOSO, crude RSO or crude OO were used in the process. Because induction times were shorter with norm NF EN 14112, the difference between the induction periods of FAAE produced from crude oils and from refined oils are less marked with this method: 7% for HOSO, 82% for RSO and 26% for OO.

**Table III.5-5: Induction periods (h) of oils and fatty acid alkyl esters (FAAE) from different sources, obtained with the Rancimat method. The method uncertainty is 15%. HOSO: High-Oleic Sunflower Oil, RSO: Rapeseed Oil, OO: Olive Oil**

	Oil		FAAE	
	NF ISO 6886 (98°C / 20L.h <sup>-1</sup> / 3g)	NF EN 14112 (110°C / 10L.h <sup>-1</sup> / 3g)	NF ISO 6886 (98°C / 20L.h <sup>-1</sup> / 3g)	NF EN 14112 (110°C / 10L.h <sup>-1</sup> / 3g)
Crude HOSO	65.7h	24.6h	50.7h	23.3h
Refined HOSO	56.8h	23.8h	30.8h	21.7h
Crude RSO	18.1h	7.5h	25.1h	10.4h
Refined RSO	17h	7.9h	12.8h	5.7h
Crude OO	> 70h	37.1h	> 70h	17.5h
Refined OO	36.1h	12.2h	34.8h	13.9h

The induction times obtained here were much higher than those reported in a number of works with distilled and non-distilled methyl esters. For example, Knothe (2007)<sup>[7]</sup> listed induction times of esters obtained via alkali-synthesis, reported in the literature. The oxidative stability index (found using a method very similar to NF EN 14112) was about 2.9h for

distilled sunflower methyl esters. The induction time for undistilled FAAE synthesized from rapeseed oil was about 6.9h in a Rancimat at 110°C. The lipase-catalyzed transesterification process provided oxidative stabilities 2- to 10-fold higher according to the raw material. Beyond the nature of the oils, where the degree of unsaturation has a very strong influence on the oxidative resistance of the resulting FAAE, the enzymatic transesterification of crude oils enhances the natural antioxidant content in the FAAE thus optimizing the oxidative stability. It is remarkable that whatever the transesterified oil, induction times are widely above the minimum value required by the norms.

#### **III.6 Conclusion**

The butanolysis catalysed by Novozyme 435 in a continuous packed bed reactor with *tert*-butanol as solvent enabled the efficient and stable production of FAAE from different vegetable oils. The fate of the minor components present in the initial crude oils was estimated in the final product. Except for an effect of dilution due to the reaction process itself, phospholipids as well as tocopherols, sterols and phenolic compounds were preserved in the final product mixture. This indicates that they were correctly evacuated from the reactor, insuring a long operational stability for the process. Because the reaction conditions were mild and no excessive exposure to ambient air occurred, no oxidative stress was engendered by the biocatalytic process, preserving the oxidation state of the oils. The presence of high amounts of natural antioxidants in the FAAE mixtures obtained from crude oils confers particular properties of oxidative resistance, greater than standard requirements.

### **Acknowledgements**

Work was financially supported by Syngenta Seeds SAS and the 'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie' (ANRT). The authors would like to thank Peter Winterton of Toulouse University who helped to correct the English version of the manuscript

### **III.7 References**

1. **Sheehan, J., V. Camobreco, J. Duffield, H. Shapouri, M. Graboski, and K.S. Tyson.** *An Overview of Biodiesel and Petroleum Diesel Life Cycles*. National Renewable Energy Laboratory (2000). p. 5-8.
2. **Knothe, G., J. Van Gerpen, and J. Krahl.** *The biodiesel handbook*, Champaign, Illinois, USA: AOCS Press 2005.
3. **Kohashi, H.** *Application of fatty acid esters for lubricating oil*, in *World Conference on Oleochemicals Into the 21st Century: Proceedings*, T.H. Applewhite, Editor., AOCS press: Champaign, Illinois, USA 1991. p. 243-250.
4. **Choe, E. and D.B. Min.** *Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation*. *Compre Rev Food Sci Food Safety* (2006). **5**: p. 169-186.
5. **Frankel, E.N.** *Lipid oxidation*. PJ Barnes & Associates, ed. s. edition, Bridgwater, England: Oily Press Dundee 2005.
6. **Knothe, G.** *Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters*. *Fuel Proc. Technol.* (2005). **86**: p. 1059-1070.
7. **Knothe, G.** *Some aspects of biodiesel oxidative stability*. *Fuel Proc. Technol.* (2007). **88**: p. 669-677.
8. **McCormick, R.L., M. Ratcliff, L. Moens, and R. Lawrence.** *Several factors affecting the stability of biodiesel in standard accelerated tests*. *Fuel Proc. Technol.* (2007). **88**: p. 651-657.
9. **Isbell, T.A., T.P. Abbott, and K.D. Carlson.** *Oxidative stability index of vegetable oils in binary mixtures with meadowfoam oil*. *Ind. Crops Prod.* (1999). **9**: p. 115-123.
10. **Verhé, R., T. Verleyen, V. Van Hoed, and W. De Greyt.** *Influence of refining of vegetable oils on minor components*. *J Oil Palm Res* (2006). p. 168–179.

11. **Judde, A., P. Villeneuve, A. Rossignol-Castera, and A. Le Guillou.** *Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols.* J. Am. Oil Chem. Soc. (2003). **80**: p. 1209-1215.
12. **Salis, A., M. Monduzzi, and V. Solinas.** *Use of lipases for the production of biodiesel,* in *Industrial Enzymes: structure, function and applications,* J. Polaina and A.P. MacCabe, Editors., Springer 2007. p. 317-339.
13. **Meher, L.C., D. Vidya Sagar, and S.N. Naik.** *Technical aspects of biodiesel production by transesterification--a review.* Renew Sustain Energy Rev (2006). **10**: p. 248-268.
14. **Hills, G.** *Industrial use of lipases to produce fatty acid esters.* Eur. J. Lipid Sci. Technol. (2003). **105**: p. 601-607.
15. **Slotema, W.F., G. Sandoval, D. Guieysse, A.J.J. Straathof, and A. Marty.** *Economically pertinent continuous amide formation by direct lipase-catalyzed amidation with ammonia.* Biotechnol. Bioeng. (2003). **82**: p. 664-669.
16. **Colombie, S., R.J. Tweddell, J.S. Condoret, and A. Marty.** *Water activity control: a way to improve the efficiency of continuous lipase esterification.* Biotechnology and Bioengineering (2000). **60**: p. 362-368.
17. **Marty, A., V. Dossat, and J.S. Condoret.** *Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds.* Biotechnol. Bioeng. (1997). **56**: p. 232-237.
18. **Dossat, V., D. Combes, and A. Marty.** *Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production.* Enzyme. Microb. Technol. (1999). **25**: p. 194-200.
19. **Talukder, M., J. Wu, T. Van Nguyen, N. Fen, and Y. Melissa.** *Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods.* J. Mol. Catal. B Enzym. (2009). **60**: p. 106-112.
20. **Watanabe, Y., Y. Shimada, A. Sugihara, and Y. Tominaga.** *Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized Candida antarctica lipase.* J. Mol. Catal. B Enzym. (2002). **17**: p. 151-155.
21. **Lai, C.-C., S. Zullaikah, S.R. Vali, and Y.-H. Ju.** *Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil.* J. Chem. Technol. Biotechnol. (2005). **80**: p. 331-337.
22. **Royon, D., M. Daz, G. Ellenrieder, and S. Locatelli.** *Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent.* Bioresour. Technol. (2007). **98**: p. 648-653.

- 
23. **Séverac, E., O. Galy, F. Turon, C.A. Pantel, J.-S. Condoret, P. Monsan, and A. Marty.***Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact.* Enzyme. Microb. Technol. **doi:10.1016/j.enzmictec.2010.09.008.**
  24. **International organization for standardization.** *Method NF EN ISO 9936 - Animal and vegetable fats and oils -- Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography;* 2006.
  25. **International Organization of Standardization.** *Method NF EN ISO 12228 - Animal and vegetable fats and oils -- Determination of individual and total sterols contents -- Gas chromatographic method* 1999.
  26. **International Organization of Standardization.** *Method NF EN ISO 10540-1 - Animal and vegetable fats and oils -- Determination of phosphorus content -- Part 1: Colorimetric method* 2003.
  27. **International Organization of Standardization.** *Method NF EN ISO 10540-2 - Animal and vegetable fats and oils -- Determination of phosphorus content -- Part 2: Method using graphite furnace atomic absorption spectrometry* 2003.
  28. **Gutfinger, T.***Polyphenols in olive oils.* J. Am. Oil Chem. Soc. (1981). **58:** p. 966-968.
  29. **International Organization of Standardization.** *Method NF ISO 6886 - Animal and vegetable fats and oils -- Determination of oxidative stability (accelerated oxidation test)* 2006.
  30. **European Committee for Standardization.** *Methods NF EN14112 - Determination of Oxidation Stability (Accelerated Oxidation Test);* 2003.
  31. **Fröhlich, A. and S. Schober.***The influence of tocopherols on the oxidation stability of methyl esters.* J. Am. Oil Chem. Soc. (2007). **84:** p. 579-585.
  32. **Hamilton, R.J., C. Kalu, G.P. McNeill, F.B. Padley, and J.H. Pierce.***Effects of tocopherols, ascorbyl palmitate, and lecithin on autoxidation of fish oil.* J. Am. Oil Chem. Soc. (1998). **75:** p. 813-822.
  33. **Carelli, A.A., L.N. Ceci, and G.H. Crapiste.***Phosphorus-to-phospholipid conversion factors for crude and degummed sunflower oils.* J. Am. Oil Chem. Soc. (2002). **79:** p. 1177-1180.
  34. **Gutiérrez-Ayesta, C., A.A. Carelli, and M.L. Ferreira.***Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids.* Enzyme. Microb. Technol. (2007). **41:** p. 35-43.

- 
35. **Chojnacka, A., W. G adkowski, G. Kie bowicz, and C. Wawrze czyk.***Enzymatic enrichment of egg-yolk phosphatidylcholine with -linolenic acid.* *Biotechnol. Lett.* (2009). **31**: p. 705-709.
36. **Peng, L., X. Xu, H. Mu, C.-E. Høy, and J. Adler-Nissen.***Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology.* *Enzyme. Microb. Technol.* (2002). **31**: p. 523-532.
37. **Dunn, R.O.***Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel).* *Fuel Proc. Technol.* (2005). **86**: p. 1071-1085.
38. **Winkler, J.K. and K. Warner.***The effect of phytosterol concentration on oxidative stability and thermal polymerization of heated oils.* *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (2008). **110**: p. 455-464.
39. **Gordon, M.H. and P. Magos.***The effect of sterols on the oxidation of edible oils.* *Food Chem.* (1983). **10**: p. 141-147.
40. **Bostyn, S., F. Duval-Onen, C. Porte, J.-P. Coïc, and H. Fauduet.***Kinetic modelling of the degradation of the [alpha]-tocopherol in biodiesel-rape methyl ester.* *Bioresour. Technol.* (2008). **99**: p. 6439-6445.
41. **Cai-ying, B.O., B.I. Liang-wu, W. Yu-min, Z. Qiu-ge, Z. Zhen-dong, L.I. Dong-mei, G.U. Yan, W. Jing, and Z. Yong-hong.***Influence of Polyphenolic Acid Esters as Stabilizer on Room-temperature Stability of Biodiesel.* *Chemistry and Industry of Forest Products* (2009). p. 02.
42. **Moser, B.R.***Comparative oxidative stability of fatty acid alkyl esters by accelerated methods.* *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2009). **86**: p. 699-706.

IV : PUBLICATION N°3 :

**SELECTION DE LA METHODE D'IMMOBILISATION DE CALB POUR  
CATALYSER LA TRANSESTERIFICATION CONTINUE D'HUILES  
VEGETALES: ANALYSE DE L'IMPACT ECONOMIQUE.**

---

---

**Etienne Séverac<sup>b</sup>**, Olivier Galy<sup>a</sup>, Fabrice Turon<sup>b</sup>, Catherine Azzaro Pantel<sup>c</sup>, Jean-Stéphane Condoret<sup>c</sup>, Pierre Monsan<sup>a</sup> and Alain Marty<sup>a\*</sup>.

---

---

<sup>a</sup> 1) Université de Toulouse; INSA,UPS,INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077  
Toulouse, France

2) INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400  
Toulouse, France

3) CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

<sup>b</sup> Syngenta Seeds, 12 Chemin Hobit. B.P.27 31790 Saint Sauveur, France

<sup>c</sup> Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique UMR CNRS5503  
ENSIACET/INP/UPS,  
4, allée Emile Monso, BP 84234, F-31432 Toulouse, cedex 4, France

\* Correspondance : Alain Marty, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et  
Procédés, Institut National des Sciences Appliquées, 135 Avenue de Rangueil, 31077  
Toulouse Cedex4, France, Tel : +33 (0)5 61 55 94 39, Fax : +33 (0)5 61 55 94 00, Email :  
alain.marty@insa-toulouse.fr

---

Accepté dans **Enzyme and Microbial Technology**

(*Impact factor : 2,638*)

---

Titre abrégé: Immobilisation de CalB : une analyse économique

## IV.1 Résumé

Les outils enzymatiques de transestérification des huiles végétales sont nombreux et souvent très performants. Néanmoins, leurs utilisations dans des procédés industriels sont encore restreintes. Le facteur limitant de leur développement en est un prix souvent prohibitif. Aussi, le développement de nouveaux biocatalyseurs dont le coût de revient serait maîtrisé et assurant une stabilité maximale du biocatalyseur permettrait de nouvelles applications industrielles. Il est montré que la stabilité des réacteurs à lit fixe est obtenue lorsque les produits polaires, capables de s'adsorber sur les supports enzymatiques (eau au cours des réactions d'estérification, le glycérol au cours des transestérifications, d'autres composés polaires), sont complètement évacués du réacteur. Les équilibres d'adsorption dépendent d'une part du milieu réactionnel, et d'autre part, du support d'immobilisation. Ceux-ci doivent donc être choisis en vue de limiter ces adsorptions.

La lipase B de *Candida antarctica* (CalB) est très appréciée pour son absence de spécificité vis-à-vis des positions des résidus d'acides gras sur le squelette de glycérol des triglycérides. Sa forme immobilisée commerciale, le Novozyme 435, met en œuvre un polymère de méthyl-métacrylate, le Lewatit VP OC 1600, dont la polarité moyenne peut être limitante. En effet, le glycérol qui est produit lors de la réaction est capable de se fixer sur le support conduisant à des diminutions de capacité catalytique de l'enzyme. Dès de faibles quantités de glycérol adsorbé ( $0,15 \text{ g.g}^{-1}$ ), l'activité initiale relative est diminuée, pour être totalement perdue pour des teneurs de  $0,9 \text{ g.g}^{-1}$ . Cela se traduirait en conditions de catalyse continue par une stabilité opérationnelle faible.

#### IV-Immobilisation de CalB : une analyse économique

CalB est disponible dans le commerce sous une seconde forme, libre en solution (Lipozyme CalB L). Son immobilisation sur le support le plus hydrophobe qui soit présenté dans la littérature, l'Accurel MP (un polymère de polypropylène) est donc une solution pour assurer la stabilité opérationnelle. En effet, nous montrons que ce support, au contraire du Lewatit VP OC 1600, ne permet pas l'adsorption du glycérol, que ce soit dans un milieu polaire, ou dans un milieu apolaire.

L'immobilisation de CalB sur support d'Accurel MP a été optimisée. Les meilleures performances ont été obtenues avec de l'Accurel MP 1001 (taille des particules < 1000 $\mu$ m). Un prétraitement du support impliquant la présence d'acétone permet de maximiser les taux d'adsorption et les quantités de protéine immobilisées. L'analyse des coûts de production de ce nouveau biocatalyseur montre une grande dépendance de son prix de revient avec le ratio entre la quantité d'enzyme utilisée et la quantité de support mise en contact : plus ce rapport est grand (biocatalyseur le plus actif), plus le coût de production est élevée ; inversement, plus le rapport est faible (biocatalyseur moins actif), plus le coût de revient est diminué.

Une analyse économique permet d'explorer l'impact de cette immobilisation sur le développement d'un réacteur à lit fixe de taille industrielle. Les coûts d'investissement pour le réacteur, dimensionné en fonction de l'activité de l'enzyme immobilisée produite, sont estimés grâce à des méthodes empruntées au domaine du génie chimique. La valeur nette actualisée (VNA) est une fonction consistant à comparer les gains d'un procédé (projet) à son investissement initial. Etant donné que la productivité est fixée, la maximisation de la VNA appliquée sur le procédé enzymatique développé a été obtenue par la minimisation des coûts relatifs à l'enzyme. Cela permet de déterminer que le principal centre de coût est largement représenté par le poste biocatalyseur (apport initial et renouvellement). Il peut représenter de 2

#### IV-Immobilisation de CalB : une analyse économique

à 10 fois les dépenses en investissement de construction du procédé. En conséquence, les conditions optimales d'immobilisation sont définies comme un compromis entre rendement d'immobilisation (90%), l'activité finale du biocatalyseur, le volume de réacteur et l'investissement total. Après optimisation, le nouveau biocatalyseur permet de réduire les coûts globaux d'environ 50% par rapport au procédé utilisant Novozyme 435.

**Mots clés** : Lipase B de *Candida antarctica*, immobilisation, reacteur à lit fixe, transesterification, valeur nette actualisée, Accurel MP

**SELECTION OF CALB IMMOBILIZATION METHOD TO BE USED IN  
CONTINUOUS OIL TRANSESTERIFICATION: ANALYSIS OF THE  
ECONOMICAL IMPACT.**

---

---

**Etienne Séverac<sup>b</sup>, Olivier Galy<sup>a</sup>, Fabrice Turon<sup>b</sup>, Catherine Azzaro Pantel<sup>c</sup>, Jean-Stéphane Condoret<sup>c</sup>, Pierre Monsan<sup>a</sup> and Alain Marty<sup>a\*</sup>.**

---

---

<sup>a</sup> 1) Université de Toulouse; INSA,UPS,INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077  
Toulouse, France

2) INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400  
Toulouse, France

3) CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

<sup>b</sup> Syngenta Seeds, 12 Chemin Hobit. B.P.27 31790 Saint Sauveur, France

<sup>c</sup> Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique UMR CNRS5503  
ENSIACET/INP/UPS,  
4, allée Emile Monso, BP 84234, F-31432 Toulouse, cedex 4, France

\* Correspondence : Alain Marty, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et  
Procédés, Institut National des Sciences Appliquées, 135 Avenue de Rangueil, 31077  
Toulouse Cedex4, France, Tel : +33 (0)5 61 55 94 39, Fax : +33 (0)5 61 55 94 00, Email :  
alain.marty@insa-toulouse.fr

---

Accepted in **Enzyme and Microbial Technology**

*((Impact factor : 2,638))*

---

Abbreviated title: CalB Immobilization: an economical study.

## IV.2 Abstract

Enzymatic transesterification of triglycerides in a continuous way is always a great challenge with a large field of applications for biodiesel, bio-lubricant, bio-surfactant... productions. The lipase B from *Candida antarctica* (CalB) is the most appreciated enzyme because of its high activity and its non regio-selectivity toward positions of fatty acid residues on glycerol backbone of triglycerides. Nevertheless, in the field of heterogeneous catalysis, we demonstrated that the medium hydrophilic nature of the support used for its commercial form (Lewatit VPOC1600) is a limitation. Glycerol is adsorbed onto support inducing drastic decrease in enzyme activity. Glycerol would form a hydrophilic layer around the enzyme resulting in diffusional limitations during triglyceride transfer to the enzyme. Accurel MP, a very hydrophobic macroporous polymer of propylene, was found to not adsorb glycerol. Immobilization conditions using this support were optimized. The best support was Accurel MP1001 (particle size < 1000µm) and a pre-treatment of the support with acetone instead of ethanol enables the adsorption rate and the immobilised enzyme quantity to be maximized.

An economical approach (maximisation of the process net present value) was expanded in order to explore the impact of immobilisation on development of an industrial packed bed reactor. The crucial ratio between the quantity of lipase and the quantity of support, taking into account enzyme, support and equipped packed-bed reactor costs was optimized in this sense. The biocatalyst cost was found as largely the main cost centre (2 to 10 times higher than the investments for the reactor vessel). In consequence, optimal conditions for immobilization were a compromise between this immobilization yield (90% of lipase immobilized), biocatalyst activity, reactor volume and total investments.

**Keywords:** Lipase B from *Candida antarctica*, immobilization, packed bed reactor, transesterification, net present value, Accurel MP.

### **IV.3 Glossary.**

CalB: Lipase B from *Candida Antarctica*

PBR: Packed Bed Reactor

pNPB: para-NitroPhényl Butyrate

2M2B: 2-méthyl-2-butanol

$V_f$ : immobilised lipase activity ( $\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{sup}}^{-1}$ )

$V_{\text{sat}}$ : immobilised lipase activity at support saturation ( $\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{sup}}^{-1}$ )

$A_f$ : residual free lipase activity in supernatant ( $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

$K_{\text{lip}}$ : lipase constant of adsorption ( $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

$m_x$  : mass of the considered element x (kg).

$\text{Cost}_x$  : Cost the considered element x (€/kg)

$V_{\text{PBR}}$ : PBR volume (L)

$V_b$ : Batch reaction volume (L)

D: PBR diameter (cm)

L: PBR Length (cm)

P: Pressure (bar)

$t_{\text{PBR}}$ : PBR inner wall thickness (mm)

$W_{\text{ENZ}}$ : Mass of immobilised enzyme in PBR (g)

$W_b$ : Mass of immobilised enzyme in a batch reaction (g)

$S_t$ : Substrate concentration at instant t (M)

$T_s$ : residence time in the PBR (s)

$t_s$ : residence time in an element of volume (s)

q: process flow rate ( $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ )

MSECI: Marshall and Swift Equipment Cost Index

CEPCI: Chemical Engineering Plant Cost Index

$\alpha$ : coefficient of soldering

t: maximal acceptable pressure for the PBR material (bar)

$\rho_s$ : volumetric mass for the PBR material ( $\text{kg.m}^3$ )

$C_{\text{PBR}}$ : PBR capital costs (€)

$f_f$ : form corrective factor (Chauvel).

$f_t$ : thickness corrective (Chauvel).

$f_m$ : material correction factor (Chauvel).

$R_{\text{\$}}$ : average exchange rate between dollar and euro for 2009

$C_p^0$ : Procurement cost of equipment operating at ambient pressure and using carbon steel construction (Turton *et al.*).

$F_M$ : material factor (Turton *et al.*).

$F_P$ : pressure factor (Turton *et al.*).

NPV: Net present value (€)

a: country tax rate (%)

i: price deflator (%)

$t_D$ : process depreciation time (year)

$I_x$ : Investment costs of element x (€).

$E_x$ : operating costs of element x (€)

$R_{\text{process}}$ : Process global incomes (€)

$D_x$ : depreciation charges of element x (€)

$t_{\text{ENZ}}$ : Enzyme life-time (year).

## **IV.4 Introduction**

Alkyl esters synthesized from vegetable oils are molecules used in a wide range of industrial applications: bio-fuels, bio-surfactants, bio-lubricants, bio-solvents, hydraulic and drilling fluids, dispersing agents, cosmetics etc.<sup>[1-3]</sup> They represent an alternative to fossil-based products which are finite resources and are known to accelerate climate disorders due to greenhouse effect gas emissions. Fatty acid esters present a lower toxicity, a higher biodegradability and are renewable leading to a lower carbon balance<sup>[3-5]</sup>.

Alkyl esters are the result of the reaction between a fatty acid either in its free form (esterification) or contained in a triacylglycerol (trans-esterification) and an alcohol; the by-product of the reaction is respectively water or glycerol. The alkyl ester industrial production is usually performed by chemical alkaline or acidic processes. These chemical methods yield a high conversion ratio to alkyl esters in a short time (4-10h)<sup>[6, 7]</sup>. However, chemical catalysis could have some unavoidable disadvantages. This chemical synthesis often presents poor reaction selectivity, leading to undesirable side-reactions. Furthermore, these processes are often high energy consumers. The recovery of glycerol is often difficult and a large amount of alkaline waste water from catalysts is produced<sup>[6, 7]</sup>. The use of triacylglycerol lipases (E.C. 3.1.1.3) as biocatalysts has been developed as an alternative route to the conventional chemical process, as it is considered as an effective way to overcome these drawbacks<sup>[8, 9]</sup>.

Many studies have shown the ability of enzymes to catalyse either esterification of fatty acids or trans-esterification of triacylglycerols from oils<sup>[6, 10, 11]</sup>. In spite of the wide range of possibilities and the great interest for enzymatic catalysis, industrial processes involving lipase are relatively scarce and limited. The main issue regarding enzymatic processes is the relatively high cost of the catalyst<sup>[12, 13]</sup>. The first way to reduce economical impact of enzyme costs is to be able to recover and reuse it thanks to immobilization process<sup>[14]</sup>. A

proper immobilization strategy may improve enzyme thermostability and resistance towards the environment (pH, solvents.) and to increase the observed synthesis activity compared with non immobilized enzyme by spreading the enzyme on a large surface area <sup>[15, 17]</sup>. The most commonly used lipase is the lipase B from *Candida antarctica* (CalB), physically adsorbed on a methyl-methacrylate resin (*Lewatit VP OC 1600*), also commercially known as Novozyme 435<sup>®</sup>. This biocatalyst, developed by Novozymes, Denmark, presents applications in a number of industrial processes such as the synthesis of optically active compounds in the pharmaceutical industry <sup>[18, 19]</sup>, in the synthesis of polymers <sup>[20]</sup>, in the synthesis of esters used in the flavor industry <sup>[21]</sup> or in production of FAEE for the biodiesel industry <sup>[22, 23]</sup>. The enzyme has been developed for synthesis of high added value products where the high cost of the catalyst has just a limited impact. Nevertheless, in many applications, the high costs of the lipase represent the first limitation, especially in biodiesel industry where lack of stability due to short alcohols <sup>[22]</sup> or to the production of hydrophilic glycerol <sup>[24]</sup> is observed. Development of less expensive immobilized enzymes would enable new processes to be developed.

Another way to decrease the operational enzyme cost is to increase the operational stability of the biocatalyst. It is crucial for its industrial applicability because it will directly influence the enzyme cost per kilogram of product <sup>[25, 26]</sup>.

The use of immobilized lipase in continuous reactors significantly reduces the incidence of the catalyst added cost on the product. Tubular packed bed reactors (PBR) lead to a higher performance than stirred-tank reactors and avoid enzyme support attrition <sup>[23, 27, 28]</sup>. However, to develop an economically relevant process, operational stability of the enzyme has to remain very high, for several weeks or even several months without significant activity loss. In this field of heterogeneous catalysis, the crucial point is to be able to control the partition of the produced polar compounds (water or glycerol) between the reaction medium and the enzyme support <sup>[24, 29, 30]</sup>. Adsorption of these polar compounds onto the enzyme support leads to a

hydrophilic hindrance around the enzyme resulting in diffusional limitations for hydrophobic substrates to migrate from the liquid phase to the enzyme active site. As shown by Marty *et al* [29] and Dossat *et al* [30] adsorption of water or glycerol has a dramatic effect, in terms of activity of the enzyme, upon esterification or trans-esterification reactions. Reactant partition depends on both reaction medium and enzymatic support polarities. On the one hand, a solvent with moderate polarity, such as 2-methyl-2-butanol or *tert*-butanol, is able to solubilize efficiently all the reactants [25]. On the other hand, enzymatic support polarity has to be chosen in order to avoid adsorption of hydrophilic compounds.

In the present study, we are reporting the strategy of reasoned immobilisation in view of the development of an economically viable process. This PBR is developed with the aim of the transesterification of oil triglycerides with butanol according to the equation IV-1.



We chose to use high oleic sunflower oil as a model substrate. It mainly contains triolein as triglycerides. The transesterification is selected to be catalyzed by CalB with a butanol / triglycerides ratio of 5. *Tert*-butanol, a non-toxic solvent of relative low cost, was selected for its ability to preserve CalB (Novozyme 435) activity and to improve greatly its stability [31]. This solvent presents a low boiling point compared to other solvents of medium polarity, which facilitates its separation and recovery during down stream process.

We are proposing to use Accurel MP, a very hydrophobic polymer of polypropylene, as an immobilisation support in order to avoid glycerol adsorption at high substrate concentrations because it was demonstrated as very efficient for several lipase immobilizations. Batisda *et al* [32] suggested that hydrophobic supports mimic the interface created by natural substrates of lipases, fixing the open form of these enzymes. This leads in general to a hyperactivation of

lipases. CalB was reported to be prone to this interfacial adsorption process <sup>[33, 34]</sup>. A pre-treatment of the support with ethanol is widely proposed in order to enhance the penetration of aqueous solution into the hydrophobic pores <sup>[12, 35-39]</sup>.

The main objective of this paper is to couple experimental results with an economical analysis of the global process. The economical impact of the immobilisation process on the continuous packed bed reactor cost is analyzed in order to define conditions offering the best process cost-effectiveness.

### **IV.5 Material and Methods**

#### **IV.5.1 Materials**

Commercial liquid form of lipase B from *Candida antarctica*, namely Lipozyme CalB L, was a gift from Novozymes (Bagsvaerd, Denmark), Lewatit VP OC 1600 was kindly provided by Lanxess (Leverkusen, Germany). Accurel MP1000 (particle size under 1500 $\mu$ m) and MP1001 (particle size under 1000 $\mu$ m) were purchased from Membrana GmbH (Wuppertal, Germany). Pore radius are distributed in two groups varying from mesoporous to macroporous scales: one, around 10nm and the second, around 8 $\mu$ m. The specific surface area was measured at 78.92cm<sup>2</sup>/g and the total cumulative volume at 1.955cm<sup>3</sup>/g <sup>[39]</sup>.

90% Oleic acid, 99.5% glycerol, pure *p*-nitrophenyl butyrate and molecular sieve 3Å were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals and solvents (butanol, *tert*-butanol) were of the highest purity and were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium).

#### **IV.5.2 Glycerol and butanol adsorption on enzymatic support.**

Batch glycerol and butanol sorption experiments were carried out in 15 ml conical flasks at 37°C on a rotational shaker for 24 h. Dried Lewatit VP OC 1600 and Accurel MP1001 (0.25,

0.5, 0.75 and 1 g) was thoroughly mixed with 10 ml of solutions containing 250mM of glycerol and/or 1000mM of butanol and/or 1500mM of butyl-oleate. *Tert*-butanol was chosen as a solvent. After shaking the flasks for 24 h, the reaction mixture was analyzed to measure the residual glycerol and butanol concentrations. The solvent was evaporated under a flow of nitrogen and diluted for analysis. With samples containing butyl-oleate, it was necessary to extract glycerol with three volumes of water.

Glycerol adsorption on Novozyme 435<sup>®</sup> was obtained by adding 10 ml of solutions of glycerol in methanol with concentration ranging from 50g.l<sup>-1</sup> to 0g.l<sup>-1</sup> to 0.5g of Novozyme 435<sup>®</sup>. The methanol was slowly evaporated at room temperature using a flow of nitrogen.

#### **IV.5.3 Enzyme immobilisation on Accurel MP**

The Accurel particles were first suspended in 10ml of Ethanol (Protocols A and B) or 10ml of Acetone (Protocol C). The particles are mixed for 30minutes at room temperature. 10 ml 100mM phosphate buffer 100mM NaCl and 10ml Of Lipozyme CALB-L were directly added. Protocol A requires a second pre-wash with 10ml 50% Ethanol - H<sub>2</sub>O (v/v). After 30minutes it was given a gentle stir at room temperature, the mixture was replaced with 10 ml de-ionised water, decanted then washed with 10 ml fresh 100 mM phosphate buffer pH 7.2, 100 mM NaCl. 10ml of Lipozyme CalB-L were directly added to the support.

The Accurel MP in contact with enzyme was moderately shaken horizontally at room temperature for 48 h. Then, the support particles loaded with lipase were filtered from enzymatic solution, quickly washed 3 times with 20ml of 100 mM phosphate buffer pH 7.2, 100 mM NaCl to remove loosely bound lipase from the carrier.

The adsorbates were dried using a two-step procedure: the first step was done in a closed chamber crossed by an air flow at room temperature until end of evaporation. In a second

step, water activity was adjusted in a closed chamber containing activated molecular sieve. The immobilized lipase was stored at 4°C, ready for the assay of immobilised lipase activity.

### **IV.5.4 Assay of free lipase activity**

The lipase activity of free enzyme (immobilisation supernatant) was determined by monitoring the hydrolysis of *p*-nitrophenyl butyrate (pNPB) to butyrate and *p*-nitrophenol [40, 41]. 2-methyl-butan-2-ol (2M2B) was used to solubilise *p*-Nitrophenyl butyrate. Lipase activity was measured in 96-well microplates with 20 µL of the immobilisation supernatant containing the lipase, 175 µL of a 100 mM phosphate buffer pH 7.2, 100 mM NaCl and 5 µL of pNPB 40 mM in 2M2B. Activity was measured by monitoring absorbance at 405 nm at 30°C for 10min using the VersaMax tunable microplate reader apparatus (Molecular Devices, Rennes, France). One unit of free lipase activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 µmol of butyric acid per min at 30 °C and pH 7.2.

### **IV.5.5 Assay of immobilized lipase activity**

The enzymatic activity of Novozyme 435 with adsorbed glycerol was measured in a 500ml glass bottle containing oleic acid (200mM), butanol (600mM), and the immobilized enzyme (500mg) with *n*-decane previously dried with 3Å molecular sieve as a solvent. The enzymatic activity of immobilized CalB was measured in a 10ml glass tube containing oleic acid (200 mM), butanol (600mM), and the immobilized CalB (20mg) with *tert*-butanol previously dried with 3Å molecular sieve as a solvent. The reaction mixture was incubated at 60°C and magnetically stirred. Butyl-oleate synthesis was monitored by withdrawing samples at regular intervals for analysis. The reaction was stopped by centrifugation at 13500 rpm for 2minutes with an Eppendorf 5415D microtube centrifuge.

#### **IV.5.6 Analytical methods**

Butanol and butyl-oleate analysis were done using an Agilent 6890N gas-liquid chromatograph equipped with an HP5 capillary column (230 m by 0.32 mm by 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness), a split/splitless mode injector and a flame ionization detector. The split mode injection was adopted with a split ratio of 200. The oven temperature was 200°C, maintained for 3 min, raised to 280°C at rate of 10°C/min, and maintained at 280°C for 1 min, while the injector and detector temperature were set at 250°C and 270°C, respectively. The sample size was 1  $\mu\text{L}$ . The carrier gas (helium) was controlled at 2ml.min<sup>-1</sup>.

Glycerol analysis was realized thanks to a Dionex Ultimate3000 HPLC system, equipped with a Shodex RI-101 refractive index detector and a Biorad Aminex HPX-87K (300mmx7.8mm) column. Elution was carried out at 65°C isocratically with deionised water as mobile phase and a flow rate of 0.6ml.min<sup>-1</sup>. 10 $\mu\text{L}$  samples were analyzed.

### **IV.6 Results and Discussion**

#### **IV.6.1 Choice of the enzyme support**

Novozyme 435<sup>®</sup> is the most efficient non regio-specific lipase, called CalB. This enzyme is commercially immobilized on *Lewatit VP OC 1600* support, a material which presents moderate polar character, and is susceptible to be adsorbed by glycerol [24]. Figure IV.6-1 presents relative residual activity of this catalyst after adsorption of increasing glycerol quantities. Effect of glycerol adsorption into enzymatic activity was estimated using a simple model reaction, esterification of oleic acid with butan-1-ol in order to avoid the complexity of a transesterification. A very hydrophobic solvent, n-decane, was chosen to prevent glycerol

desorption. The absence of monoacylglycerol, diacylglycerol or triacylglycerol synthesis was verified during reaction through TLC analysis.

Low quantities of adsorbed glycerol (below 0.1g/g) do not affect the initial velocity. Up to this value, a rapid decrease in activity is observed, leading to a nearly complete inactivity at 0.9 g/g of adsorbed glycerol. This phenomenon was already observed by Dossat *et al.* [30] during the transesterification of sunflower oil by Lipozyme IM (*Rhizomucor miehei* lipase immobilized on Duolite A568). These authors postulated that the glycerol forms a hydrophilic layer around the enzyme impeding the mass transfer of hydrophobic substrates.

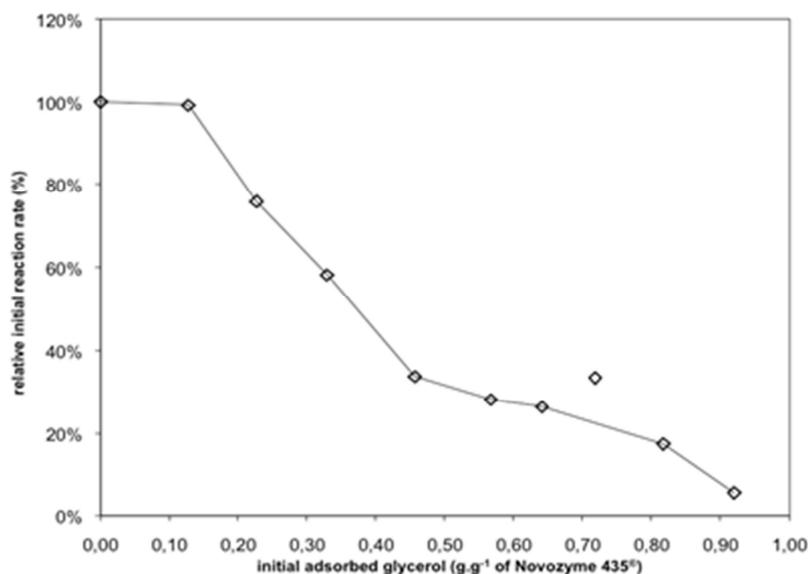


Figure IV.6-1: Relative initial reaction rates of esterification in presence of Novozyme 435<sup>®</sup> pre-treated with glycerol. Reaction conditions: substrate concentrations: 200 mM oleic acid and 600 mM butanol in *n*-decane; Novozyme 435<sup>®</sup>: 500 mg; reaction temperature: 60°C

Therefore, during the transesterification reaction of triglycerides in a continuous process, a drastic loss of reactor performances versus time is expected, due to produced glycerol adsorption. To prevent this from happening, it would be of interest to adapt the enzymatic

support polarity to avoid glycerol adsorption. The first objective was consequently to optimize support polarity for CalB immobilisation. In the literature the most used hydrophobic support is Accurel MP. Its performances were then compared with ones observed using Lewatit VP OC 1600.

Figure IV.6-2 presents the residual glycerol concentration after contact with different quantities of the two enzymatic supports in a 250 mM solution of glycerol in *tert*-butanol as solvent. A moderate adsorption of glycerol is reached for Lewatit VP OC 1600. Glycerol disappears linearly when the quantity of support is increased. If the conventional Langmuir approach for adsorption isotherm is considered <sup>[42]</sup>, the adsorption phenomenon is in the linear zone of the isotherm, far from the saturation of the support. Interestingly enough, for Accurel MP1001, glycerol adsorption is completely avoided in these conditions.

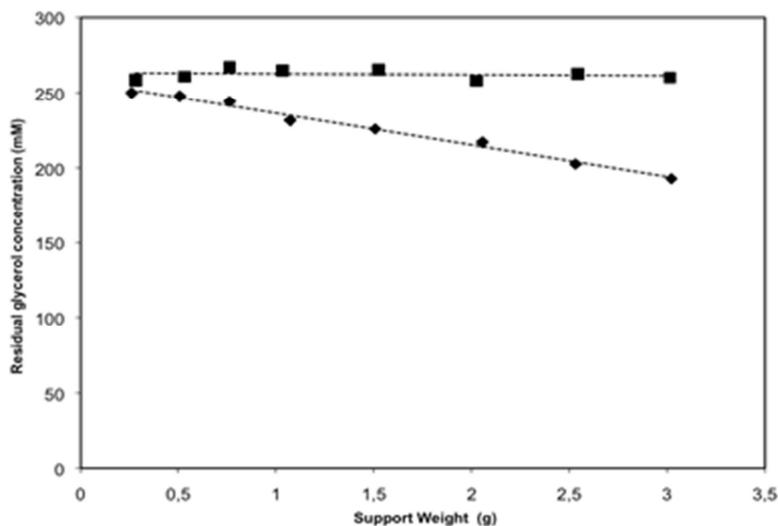


Figure IV.6-2 : Residual glycerol concentrations (mM) after contact of different quantities (g) of Accurel (■) & Lewatit VP OC 1600 (◆). Initial conditions: Glycerol concentration: 260mM in *tert*-butanol

As the partition of glycerol is also function of the medium polarity, it appears necessary to mimic the reaction medium. As a model reaction, the trans-esterification of 0.5 M of triglycerides (high oleic sunflower oil) with 2.5M of butan-1-ol (ratio 5) was chosen. The reaction medium considered for the partition study was the final composition obtained at complete conversion (1.5M butyl-ester, 1M butan-1-ol).

Butan-1-ol is not adsorbed whatever the support (data not shown).

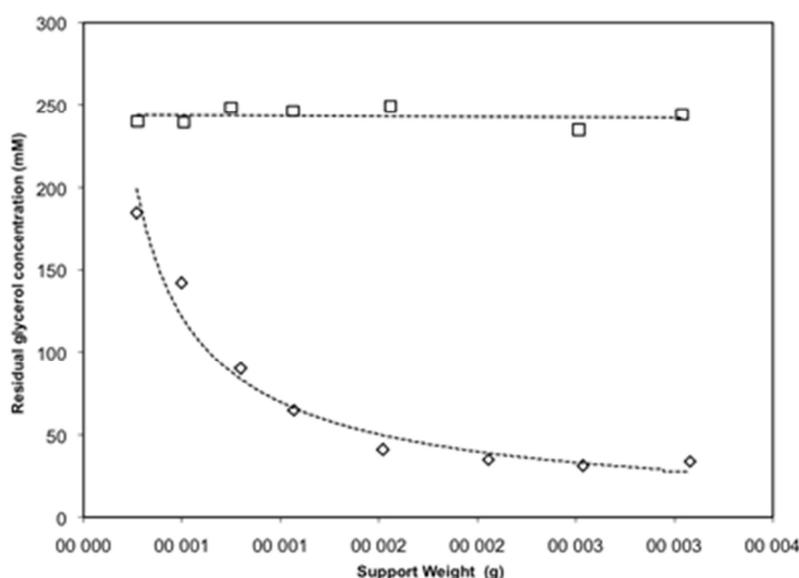


Figure IV.6-3 : Residual glycerol concentrations (mM) after contact with different quantities (g) of Accurel (□), Lewatit VP OC 1600 (◇) with a butyl-oleate and butanol containing solution of glycerol at room temperature. Initial conditions: glycerol concentration: 235mM; butyl-oleate concentration: 1500mM; butanol: 1000mM in tert-butanol.

The quantity of glycerol adsorbed on Lewatit VP OC 1600 is largely increased in this medium. This result is in accordance with the increase in  $\text{Log}(P)$  (partition coefficient between octanol and water) calculated using Cosmotherm software (Cosmologic Germany)<sup>[43]</sup>. The  $\text{Log}(P)$  of pure *tert*-butanol was estimated at 1 whereas there is a 3-fold increase in the considered reaction medium. According to the Langmuir equation<sup>[42]</sup>, saturation of the

Lewatit support is reached at a value of 1.9 g of adsorbed glycerol per g of support (Figure IV.6-3).

On the most hydrophobic support tested, Accurel MP1001, no glycerol adsorption was observed, and therefore, this support would enable perfect stability of a continuous reactor to be obtained. As a consequence, the immobilisation optimisation will be achieved with this support.

#### **IV.6.2 Optimization of CalB immobilization on Accurel MP.**

Pre-treatment of Accurel MP is needed to improve the penetration of the aqueous lipase solution into hydrophobic Accurel MP pores. In the literature, two protocols were described: protocol A consists in wetting the support with, sequentially: ethanol, aqueous ethanol solution and finally with water, with intermediary filtration <sup>[35, 36, 44]</sup>; protocol B consists in a single wetting with ethanol and then a direct contact with the enzyme solution without removing ethanol <sup>[12, 38, 39]</sup>. Ethanol improves the immobilization process by inducing a better penetration of the enzyme solution inside the very hydrophobic Accurel <sup>[37]</sup> and by reducing the enzyme thermodynamic activity, thus forcing the adsorption process. CalB being well-known for its strong tolerance to high solvent quantities, a third method (protocol C) is proposed consisting in the replacement of ethanol in protocol B by a more polar solvent, acetone. It was checked that no loss of enzyme activity occurred when acetone or ethanol were added to the lipase solution in the same conditions as during immobilisation process over 48 hours at room temperature (data not shown).

The shapes of the experimental adsorption curves suggest a Langmuir type adsorption. Justification and demonstration of this adsorption behaviour is out of the scope of this study but, for the sake of convenience, we will use a Langmuir type equation to model our results.

A typical Langmuir behaviour for protein adsorption had been already observed by Gitlesen *et al.* [38] and Al-Duri and Yong [36] for the immobilisation of lipases from *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa* and *Pseudomonas fluorescens* on Accurel MP.

Protein content determination methods are largely perturbed by salts, solvents... To get round this problem, adsorption curves were represented by the plotting of immobilized lipase activity ( $V_f$ ,  $\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{sup}}^{-1}$ ) versus the residual free lipase activity in the supernatant ( $A_f$ ,  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). This is based on the hypothesis that lipase activities are directly proportional to protein concentrations in the bulk phase for the free lipase and to the quantity of lipase adsorbed into the support for the immobilized lipase. In addition, this approach enables better conditions for enzyme activity optimisation to be easily identified. So, in this case, the Langmuir equation describing isotherm adsorption [42] is modified in equation IV-2:

$$V_f = \frac{V_{\text{sat}} \cdot A_f}{K_{\text{lip}} + A_f} \quad (\text{Eq. IV-2})$$

with  $V_{\text{sat}}$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{sup}}^{-1}$ ) the velocity at saturation and  $K_{\text{lip}}$  ( $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a constant of adsorption of CalB on Accurel.

For practical reasons (higher reaction rates, analytical facilities...), the PBR development was mimicked using a simpler reaction of esterification of oleic acid with butanol presented in equation 3 considering that the reaction optima are likely to be very similar.

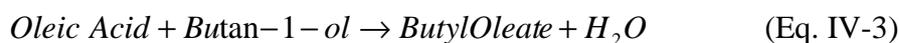


Figure IV.6-4 presents the isotherm equilibrium of CalB on Accurel MP obtained for the three immobilisation methods. Both the adsorption velocity and the maximal capacity of adsorption appear to be drastically dependent on the immobilization methods.

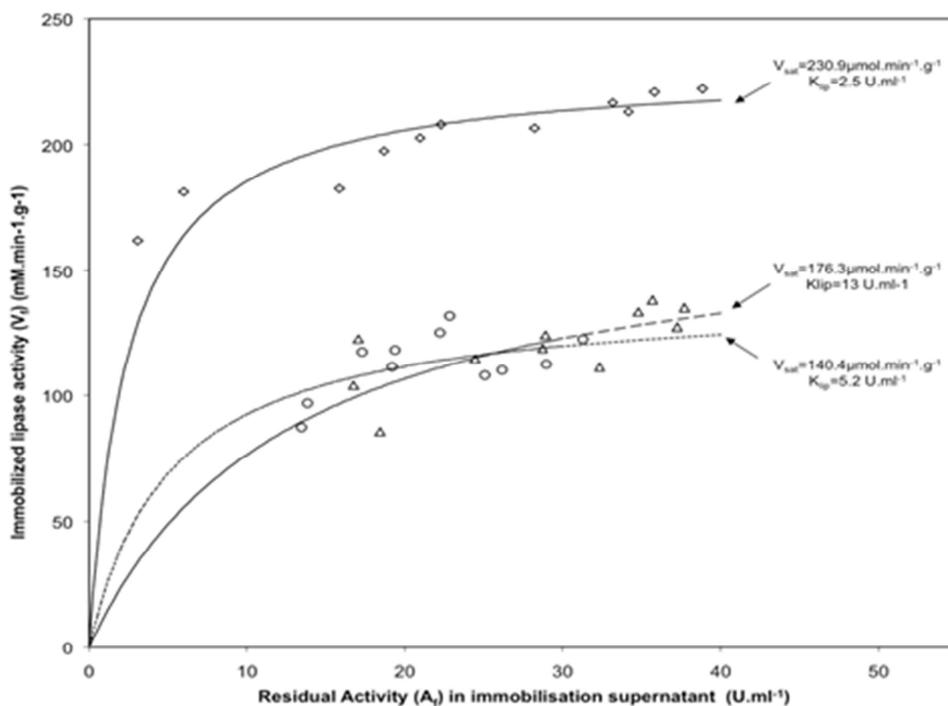


Figure IV.6-4 : Comparison of adsorption curves for the adsorption of CalB on Accurel MP1000 with protocol A (○), protocol B (Δ) and protocol C (◇) at room temperature. The dashed, dotted and solid curves are the Langmuir isotherms calculated with the parameters fitting the adsorption data obtained with protocols A, B and C respectively. Reaction conditions: substrate concentrations: 200 mM oleic acid and 600 mM butanol in tert-butanol; immobilised CalB: 20 mg; reaction temperature: 60°C

Protocols A and B led to similar maximal adsorption ( $V_{\text{sat}}$  of 140  $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  and 176  $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  respectively), whereas with protocol C the maximal adsorption was increased to 231  $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Mei *et al.* <sup>[45]</sup> have shown that for a Novozyme 435<sup>®</sup> with particle size of 600 $\mu\text{m}$ , CalB was exclusively located in the external shell of the bead, with a thickness of 80-100 $\mu\text{m}$ . The same kind of distribution of CalB in an external shell of the Accurel particle is indeed expected,

with a thickness depending on the method of immobilization. Compared to the two other methods, the use of acetone was thought to induce a deeper penetration within the support, giving access to a larger area for lipase adsorption and an extended potential maximal activity. Moreover, the affinity between enzyme and support is favored by the presence of acetone (5.2, 13.0 and 2.5 U.ml<sup>-1</sup> for methods A, B and C respectively). Acetone, which is an aprotic solvent, decreases the solubility and the thermodynamic activity of protein in solutions more efficiently <sup>[46]</sup>.

Finally, compared to the protocol A, the two protocols B and C, could be easily transposable to an *in situ* immobilization process by a simple circulation of first, the solvent and then, the lipase solution directly added to the solvent through a reactor packed with the support.

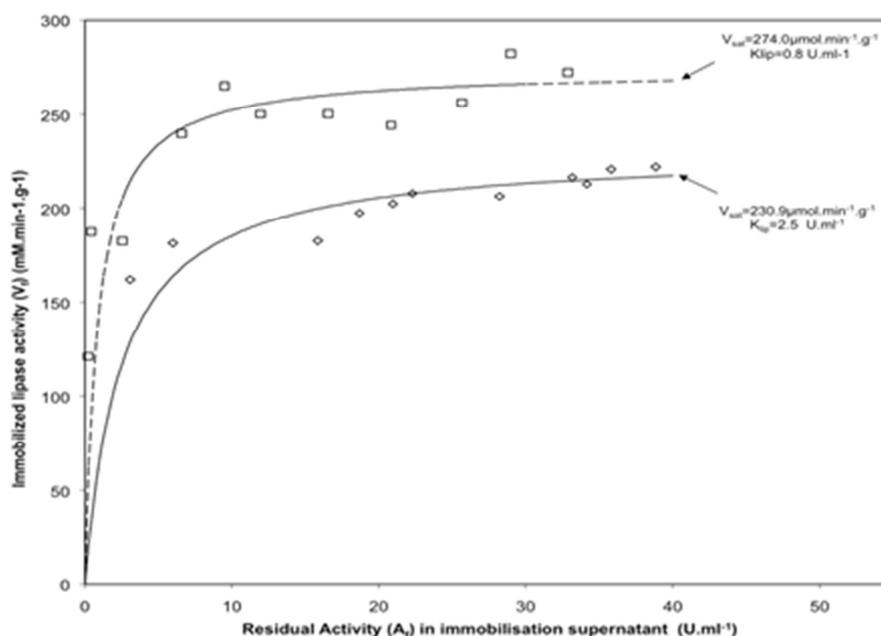


Figure IV.6-5 : Comparison of adsorption curves for the adsorption of CalB on Accurel MP1000 ( $\diamond$ ) and on Accurel MP1001 ( $\square$ ) pre-wetted with acetone (Protocol C) at room temperature. The solid and dotted curves are the Langmuir isotherms calculated with the parameters fitting the adsorption data obtained with Accurel MP1000 and MP1001 respectively. Reaction conditions: substrate concentrations: 200mM oleic acid and 600mM butanol in tert-butanol; immobilised CalB: 20mg; reaction temperature: 60°C

Different kinds of Accurel MP supports are available. Accurel MP1000 presents particle size below 1500 $\mu\text{m}$ , Accurel MP1001 below 1000 $\mu\text{m}$  and Accurel MP1004 below 400 $\mu\text{m}$ . The latest was discarded for practical reasons: it is a fine powder which can induce high pressure drop in a continuous PBR and its low density induces difficulties for the contact between phases. Figure IV.6-5 shows the adsorption curves of CalB on Accurel MP1000 and MP1001.

Oliveira *et al.* [47] have shown that the layer thickness formed by CalB within a Novozyme 435<sup>®</sup> bead is constant whatever the particle size, when the immobilization conditions are similar. As a matter of fact, they demonstrated that the smaller particle size have the highest specific enzyme content. Our results are in accordance with this effect of dilution of CalB within the support. This effect was also observed by Al-Duri and Yong [35] who have demonstrated the enhancement of lipase PS and lipolase 100L activity immobilized on Accurel EP100 when the particle size was decreased from 2500 $\mu\text{m}$  to 750 $\mu\text{m}$ . Sabbani *et al.* [48] have also reported an improved activity rate of esterification of 2-methylhexanoic acid when decreasing Accurel particle sizes were used to adsorb *Candida rugosa* lipase.

The maximal immobilized activity, calculated for the couple Accurel MP1001/protocol C, is improved by 18.7%, 55.4% and 95.1%, compared to the ones obtained with the couples Accurel MP1000/protocol C, Accurel MP1000/protocol B and Accurel MP1000/protocol A respectively; therefore, the couple Accurel MP1001/protocol C with Novozyme 435<sup>®</sup> as a reference will be used for the following demonstration.

The absence of glycerol adsorption onto Accurel support after immobilization was verified using a medium containing *tert*-butanol or a mixture of *tert*-butanol and hexane (60/40) (adsorption of glycerol was not feasible in presence of esters to avoid synthesis reactions). In every case, no glycerol adsorption was measured whatever the level of protein loading onto

the Accurel support (data not shown). Therefore, it could be concluded that CalB immobilization does not affect the positive effect of the high hydrophobicity of the support. Moreover it would suggest that glycerol accumulation principally occurs onto the matrix of hydrophilic supports.

### IV.6.3 Enzyme cost analysis

Most of immobilisation studies in the literature provide immobilisation optimisation in terms of activity, i.e., the best immobilized enzyme presents the highest activity. This is generally obtained with the highest enzyme loading on the support. It often corresponds to the use of a high lipase / support quantity ratio which is often directly related to high cost <sup>[12]</sup>.

The cost of the immobilized CalB on Accurel MP is dependent on four different factors: (i) the cost of the support, (ii) the cost of the lipase, (iii) the cost of additive products (acetone, ethanol...) and (iiii) the operating costs. In our procedure, volumes of lipase and additives were kept constant. So the main factor influencing the cost calculation is the cost of the support and by extension the ratio between support and lipase quantities. The general cost calculation is given in equation IV-4.

$$Cost_{immobilized\ lipase} = \frac{m_{support} \times cost_{support} + m_{lipase} \times cost_{lipase} + cost_{aditives} + operating\ costs}{m_{immobilized\ lipase}}$$

(Eq. IV-4)

where the  $m_x$  (kg) are the mass of the considered elements and the  $cost_x$  (€/kg) are the specific costs of the considered elements. It was considered to carry out the adsorption of lipase directly in the packed bed reactor. The unitary operation of CalB immobilisation can be simplified to the circulation of the different components through the packed Accurel, using a

system in adequacy to the proportion of volume defined in the lab conditions and including a loop for recycling of immobilization medium in order to approach the external mass transfer conditions of an agitated batch. As a consequence, operating costs were supposed to be identical whatever the immobilization conditions. The pumping costs to ensure the immobilization directly in the PBR were thought to be negligible with respect to the costs of support and lipase, and they were not included into the immobilized lipase production cost calculation.

The adsorption of lipase on a support is led by thermodynamics through partition phenomena between the solid phase and the reaction medium. These phenomena are highly dependent on the medium. So, reproducible immobilisations are only obtained when the reaction medium and more precisely the proportions of each component are completely controlled.

In the cost calculation, it is important to discuss about the treatment of the quantity of non-adsorbed enzyme after immobilisation. This quantity can be considered as lost, or can be recycled in a new immobilization process. The main choice criterion is the percentage of residual enzyme after immobilisation. The lower this percentage, the easier the residual enzyme can be considered as lost. Moreover, the recycling of enzyme leads to problems in the reproducibility of the immobilisation process. The commercial preparation of CalB contains stabilisers (sorbitol and glycerol) and preservatives (sodium benzoate and potassium sorbate). These compounds, as well as all components directly added to the enzyme for the immobilisation process (acetone, ethanol or buffer) can play an important role in the adsorption process. In the present procedure, after immobilisation, concentrations of each of these components have inevitably varied: the lipase is adsorbed and its concentration is reduced while glycerol and sorbitol are not and their concentrations are supposed to remain identical (see section IV.6.1). The recycling of the unloaded lipase is thus synonymous of restoration of initial proportions for all these components. If this adjustment were not done,

the recycling of the non-loaded lipase would lead to the production of non-homogeneous immobilised lipase batches, which is highly undesirable in an industrial process. Therefore, the non-loaded lipase was considered as lost after immobilisation in our experiments. This hypothesis will be discussed again later.

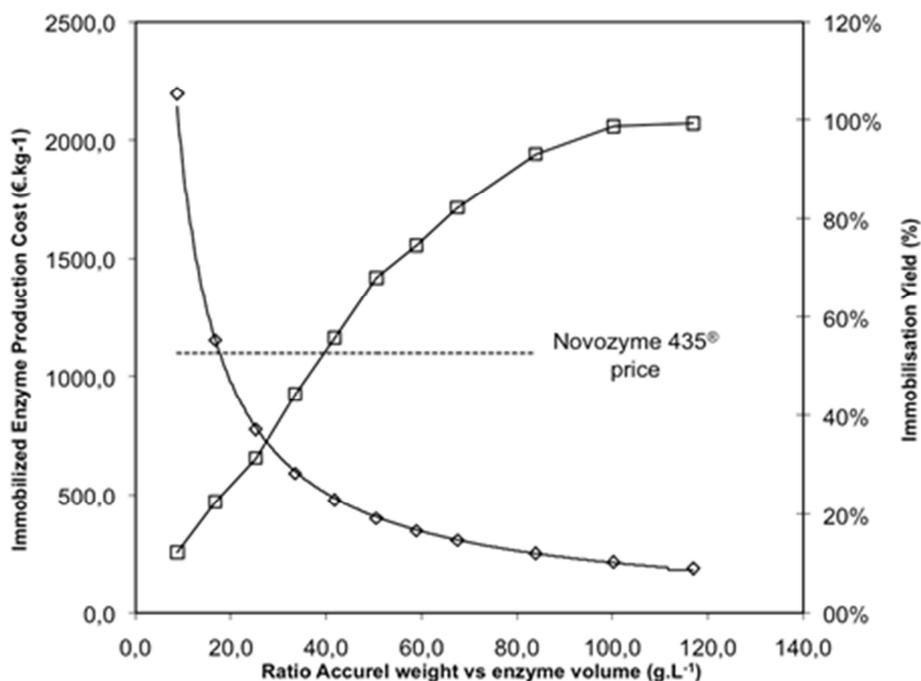


Figure IV.6-6 : Comparison between the yield of *Candida Antarctica* lipase B immobilization on Accurel MP1001 using Protocol C (□ / right axis) and the resulting production cost of the immobilized lipase (◇ / left axis) Dotted line represents the Novozyme 435® commercial price..

Figure IV.6-6 presents the calculated cost of immobilized CalB on Accurel MP1001. It appears that the ratio between the support and the lipase quantities in contact has a drastic effect on the resulting production cost. The higher the ratio between support and lipase, the lower the production cost of immobilized enzyme. As expected, the least expensive enzyme is obtained for the highest immobilisation yield with a minimal loss of enzyme. Compared to Novozyme 435® commercial price, the production cost of CalB immobilized on Accurel MP1001 can be up to 6 times less expensive.

Nevertheless, the immobilisation conditions which minimize the biocatalyst production cost lead to a biocatalyst with the lowest relative specific activity. To obtain a given productivity, higher enzyme quantity will be necessary and consequently, the reaction volume will be higher. It is of importance, then, to calculate the cost of the global process.

#### **IV.6.4 Reactor design**

The PBR is a column filled with a mass  $W_{ENZ}$  of enzymatic catalyst. The reactor is characterized by its volume  $V_{PBR}$  (L), diameter  $D$  (cm) and length  $L$  (cm). The PBR inner wall has a thickness  $t_{PBR}$  (mm).

The design was carried out according to the determination of the required quantity of each immobilized lipase needed to reach a fixed productivity. These weights were calculated by reference to the initial velocity obtained in batch reaction. In a batch reaction in a volume  $V_b$  (L) with a mass  $W_b$  (g) of enzyme, the reaction rate  $r$  ( $\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) is defined as the variation of substrate concentration  $dS$  (M) in a time lapse  $dt$  (min) (Equation IV-5)<sup>[49]</sup>.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{W_b}{V_b} r \quad (\text{Eq. IV-5})$$

The time  $t_b$  (min) necessary to obtain the transformation of  $S_o$  in  $S$  is obtained by the integration of the equation IV-6 with  $S_o$  (M) the initial substrate concentration.

$$\int_{S_o}^S \frac{dS}{r} = \frac{W_b}{V_b} t_b \quad (\text{Eq. IV-6})$$

The general equation of a PBR is given in equation IV-7 where  $t_s$  (min) is the residence time in an element of volume <sup>[49]</sup>.

$$\frac{dS}{dt_s} = \frac{W_{ENZ}}{V_{PBR}} r \quad (\text{Eq. IV-7})$$

The mass of enzyme needed to transform  $S_0$  in  $S$  is given by equation IV-8 after integration of equation 7, with  $T_s$  (min) the PBR residence time and with  $q$  the volumetric flow rate (L/min)

$$W_{ENZ} = \frac{V_{PBR}}{T_s} \int_{S_0}^S \frac{dS}{r} = q \int_{S_0}^S \frac{dS}{r} \quad (\text{Eq. IV-8})$$

From equations IV-6 and VI-8, the general equation IV-9 for calculation of the required mass in a PBR ( $W_{enz}$ ) to ensure a fixed productivity and a fixed conversion rate is obtained. In our calculation, a productivity of 10000 tons per year with a conversion rate  $X$  of 90% has been arbitrarily chosen, which corresponds to a flow rate  $q$  of  $312\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

$$W_{ENZ} = q \frac{W_b \cdot t_b}{V_b} \quad (\text{Eq. IV-9})$$

The different corresponding volumes of PBR are computed from immobilized CalB apparent density. The design of the PBR was achieved by adopting a ratio length to diameter equal to 8. Table IV.6-1 gives the characteristics of the PBR obtained for CalB immobilized on Accurel MP1001 and the corresponding enzyme expenses  $C_{enz}$  ( $C_{enz} = W_{enz} \times \text{Cost}_{\text{immobilised lipase}}$ ). Because of the wide range of immobilized lipase production costs (see section IV.6.3), the higher enzyme expenses correspond to the smaller reactors, which were obtained with the smallest ratio between Accurel, and lipase quantities put in contact for immobilization.

**Table IV.6-1 : Characteristics of the PBR developed for different conditions of CalB immobilisation on Accurel MP1001 using protocol C carrying out acetone for support pre-treatment.**

Accurel used for immobilisation (g/L immobilisation medium)	Enzyme weight in PBR $W_{enz}$ (kg)	PBR Volume $V_{PBR}$ (L)	PBR Diameter D (cm)	PBR Length L (cm)	Enzyme costs $C_{enz}$ (k€)
8	206	1719	81.8	327.2	453
16	198	1657	80.8	323.3	229
25	219	1825	83.5	333.8	169
33	292	1915	84.8	339.2	136
42	224	1869	84.1	336.5	107
50	224	1870	84.1	336.6	90
58	211	1764	82.5	330.1	74
67	234	1951	85.3	341.3	72
84	299	2495	92.6	370.5	76
100	307	2563	93.5	373.8	66
117	463	3861	107.1	428.6	88
Novozyme 435®	130	1085	70.2	280.7	143

#### **IV.6.5 Reactor cost Estimation**

The average investment costs for the PBR, assimilated to a tubular vessel, were conventionally computed by using three different methods to make up for the low level of accuracy of these methods (around 25%)<sup>[46-48]</sup>.

**Table IV.6-2 : Marshall and Swift Equipment Cost Index (MSECI) (1926 Index =100) and the Chemical Engineering Plant Cost Index (CEPCI) used in the reactor cost estimation.**

Year	MSECI all industries	CEPCI
1975	444.3	182.4
1984	780.4	322.7
1990	915.1	357.6
2001	1093.9	394.3
2009	1487.2	539.7

All the computations have been updated by using the Marshall and Swift Equipment Cost Index (MSECI) (1926 Index =100) and the Chemical Engineering Plant Cost Index (CEPCI) presented in Table IV.6-2: a corrective factor corresponding to the ratio between index from year of publication and index from present was used for update. AS304 stainless steel was chosen as a PBR construction material.

IV.6.5.1 General methodology of capital cost estimate : Chauvel *et al.* <sup>[52]</sup>, Peters & Timmerhaus <sup>[51]</sup>.

The methods, proposed both by Chauvel *et al.* <sup>[52]</sup> and Peters & Timmerhaus <sup>[51]</sup> are based on the calculation of the reactor vessel weight. In order to cope with pressure forces applied on reactor vessel inner wall, it is necessary to calculate the minimal thickness to be used for the construction of the reactor vessel (equation IV-10) from the dimensions of the reactor and the conditions of use (see chapter IV.6.4),

$$t_{PBR} = \frac{PD}{2(\alpha - 0.6P)} \quad (\text{Eq. IV-10})$$

where  $\alpha$  is a coefficient of soldering ( $\alpha$  equal to 1 in our case) and  $t$  is the maximal acceptable pressure for the chosen steel ( $t = 1195\text{bar}$  for AS304 stainless steel).  $P$  was estimated by the calculation of pressure drops in the reactor according to Darcy's Law (Reynolds number calculation applied to the different reactors ranging between 9 and 15). Because support particle size is large ( $1000\mu\text{m}$ ),  $P$  appears to be very low (between 1,2 and 1,4bar). Consequently, a traditional 8 mm thickness was adopted for design and it can be considered that the same pump can feed all PBRs

The total weight of the PBR is calculated by determining the mass  $W_{PBR}$  (kg) of the tubular vessels and their two circular ends presenting a surface area equal to the reactor vessel section and the same thickness (equation IV-11).  $\rho_s$  is the volumetric mass for the considered material.

$$W_{PBR} = \pi t_{PBR} \rho_s \left[ \frac{1}{2} \cdot (D + 2t_{PBR})^2 + L(D + t_{PBR}) \right] \quad (\text{Eq. IV-11})$$

Chauvel *et al.* [48] have established relations between the reactor vessel diameter and the price (€/kg) of plant vessel. This abacus graph is given for ordinary steel materials and for a reactor vessel thickness of 1 mm. We have converted the abacus graph for vessel diameter ranging from 250mm and 1250mm with a correlation coefficient of 0.9828. The calculation of reactor cost (€) is given in equation IV-12.

$$C_{PBR} = f_f \times f_t \times f_m \times (14.3 \times D^{-0.18}) \times W_{PBR} \quad (\text{Eq. IV-12})$$

$f_f$  is a form corrective factor (2.8 for reactor diameter below 1m and 2.5 for diameter ranging between 1m and 1.5m),  $f_t$  is a corrective factor for thickness (1 in our case) and  $f_m$  is a material correction factor (2.3 for stainless steel 304).

Peters and Timmerhaus [51] have directly described the costs of reactor vessels in US dollars as a function of their mass. From this abacus, the following equation IV-13 has been deduced with a correlation coefficient of 0.9968 over a range of weight from 250 kg to 1250kg.

$$C_{PBR} = \frac{577.6 \times W_{PBR}^{0.67}}{R_{\$}} \quad (\text{Eq. IV-13})$$

where an average exchange rate  $R_{\$}$  of 1.471 [53] between dollar and euro for 2009 was used.

#### IV.6.5.2 Methodology described by Turton et al. [50].

Turton *et al.* [50] suggest a relation for the procurement cost  $C_p^0$  of equipment operating at ambient pressure and using carbon steel construction (equation IV-14), expressed as.

$$\text{Log}C_p^0 = K_1 + K_2\text{Log}(A) + K_3[\text{Log}(A)]^2 \quad (\text{Eq. IV-14})$$

A is the capacity or size parameter for the equipment. In the case of PBR, A is equivalent to the volume of the vessels (between 0,3 and 520 m<sup>3</sup>). K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> and K<sub>3</sub> are data given by abacus and are equal to 3.4974, 0.448 and 0.1074 respectively, in the present case.

The cost of the desired equipment C<sub>PBR</sub> is obtained by giving a material factor and bare module factors F<sub>BM</sub> to the calculated C<sub>p</sub><sup>0</sup> as given in equation IV-15.

$$C_{PBR} = C_p^0 \cdot F_{BM} = C_p^0 (B_1 + B_2 F_M F_P) \quad (\text{Eq. IV-15})$$

B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> are constant depending on the type of vessels and are given in abacus graphs (equal to 2.25 and 1.82 respectively in our case). F<sub>M</sub> is a material factor (F<sub>M</sub>=1.8 in our case). F<sub>P</sub> is a pressure factor equal to 1 in the present case (low pressure).

#### IV.6.5.3 Average capital cost estimate

The three methods provide similar trends, exhibiting a similar order of magnitude. The variation between the three methods was found under the 25% of the method general accuracy. Therefore, the three capital cost estimations can be averaged in Figure 7. Contrary to the cost of immobilized enzyme which can vary greatly, the average PBR costs are slowly increasing from 22k€ to 33.3k€. The reactor cost estimated for Novozyme 435® is about 17.8k€.

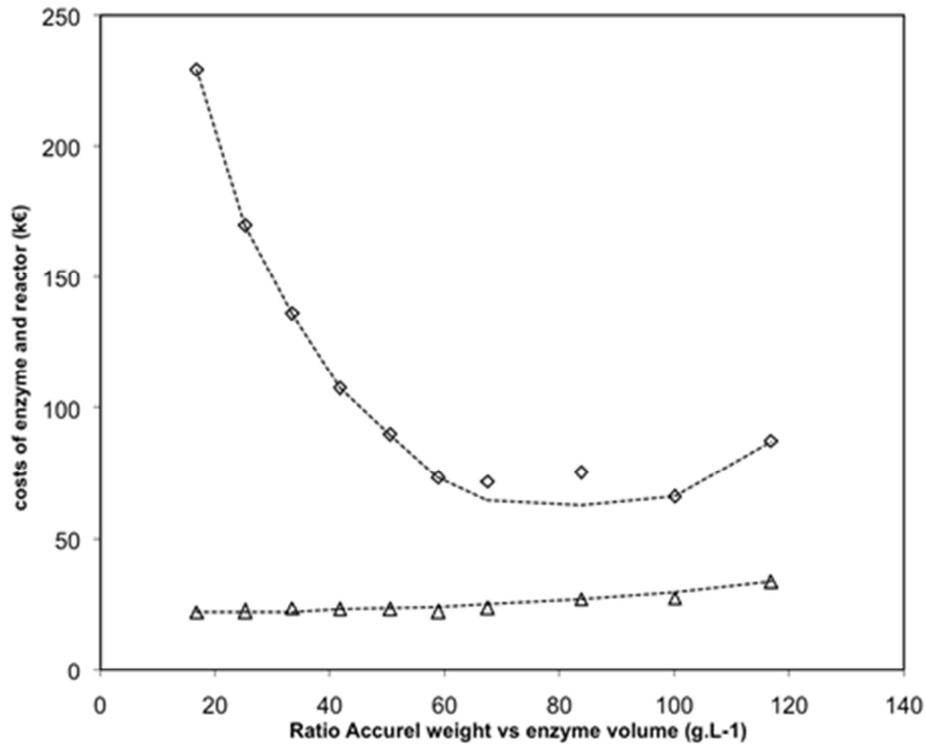


Figure IV.6-7 : Comparison between the costs of packed bed reactor designed for different conditions of immobilization of CalB on Accurel MP1001 ( $\diamond$ ) and the cost of corresponding volumes of immobilized enzyme ( $\Delta$ ).

The costs presented in Figure IV.6-7 are the procurement costs of the developed PBR and of the respective content of lipase. It does not take into account its use in production conditions (reactor depreciation, lipase renewal ...) which is dealt with in the next section 3.6. Nevertheless, the difference between these unit costs has to be highlighted, the purchase costs for the lipase being substantially higher than for the corresponding PBR. The difference can vary to a great extent, from one immobilization condition to another. For instance, a factor 10 is observed when 20g of Accurel per L of immobilization medium were used and a factor 2 is obtained for 85g of Accurel per L.

**IV.6.6 Net present value.**

The adequate choice of the immobilized lipase is carried out by maximizing the process net present value (NPV) [50-52, 54, 55]. It represents the difference between the global incomes and the global expenses (investments, maintenance and operating costs) (equation 16). The NPV is generally calculated over the process lifetime. In our calculation, it was assimilated to the process depreciation time ( $t_D$ ) which was commonly fixed to 10 years. The general calculation is given in relation IV-16, considering the country tax rate  $a$  (33% for France) and a price deflator  $i$  (fixed at 10% over 10 years) to cope with inflation over the process lifetime.

$$NPV = -I_{process} + \sum_{p=1}^{t_d} \frac{(R_{process} - E_{process} - D_{process}) \cdot (1-a) + D_{process}}{(1+i)^p} - \sum_{p=0}^{E(t_d/t_{enz})} \frac{n \cdot C_{enz}}{(1+i)^{p \cdot t_{enz}}} \quad (\text{Eq.IV-16})$$

$I_{process}$  represents the battery limits investment. It involves the costs of every process component (reactor, pump, heat exchanger, process lagging up, upstream and downstream process).  $E_{process}$  represents the process operating costs (raw materials, utilities, labour ...). The costs due to the catalyst  $C_{enz}$  have to be treated separately from others. As usual, these costs have been taken into account at year 0 and are added to the operating costs, according to the own enzyme lifetime  $t_{enz}$ . Consequently, an additional term is considered only at the year corresponding to enzyme replacement. The number of replacement is defined by the entire part of the ratio between the process and enzyme lifetimes  $E(t_d/t_{enz})$ . If the immobilized lipase stability is under 1 year, a factor  $n$  is necessary to increase the catalyst costs by the number of change per year. For a lipase stability up to 1 year, the factor  $n$  is equal to 1.

$D_{process}$  are the process depreciation charges and are considered as linear over the depreciation time ( $D_{process} = I_{process} / t_d$ ).

$R_{process}$  represents the global incomes associated with the process operating.  $R_{process}$  directly depends on the productivity and on the manufactured product selling price. Considering a fixed production for the different PBR,  $R_{process}$  is constant whatever the considered immobilized lipase. Thereby, the NPV is maximised when the global expenses  $E_{total}$  are minimised (equation IV-17).

$$E_{total} = I_{process} + \sum_{p=1}^{t_d} \frac{(E_{process} + D_{process}).(1-a) - D_{process}}{(1+i)^p} + \sum_{p=0}^{E(t_d/t_{enz})} \frac{n.C_{enz}}{(1+i)^{p.t_{enz}}} \quad (\text{Eq. IV-17})$$

The process production being fixed, only the expenses directly dependent on the nominal lipase activity are variable. All the other expenses (heat exchanger and pumping system expenses, energy and labour costs etc...) are constant and are not involved in the discrimination of the different immobilised lipases. Therefore, the minimisation of  $E_{total}$  can be simplified by the minimisation of the only investments made for PBR design and the only costs of catalyst spent over the reactor lifetime (equation IV-18).

$$E = I_{PBR} + \sum_{p=0}^{E(t_d/t_{enz})} \frac{n.C_{enz}}{(1+i)^{p.t_{enz}}} + \sum_{p=1}^{t_d} \frac{-aD_{PBR}}{(1+i)^p} \quad (\text{Eq. IV-18})$$

where  $I_{PBR}$  are PBR investment costs and  $D_{PBR}$  are the PBR depreciation charges.

The lipase total cost over the reactor lifetime is highly dependent on the stability of the lipase (lifetime  $t_{enz}$ ) and thus on its renewal. For example, if a price deflator  $i$  of 10% and an enzyme lifetime of one-year are considered, the lipase cost at termination (10 years) is increased by a factor of 7.1 as compared to the unit cost of one packing load (Figure IV.6-7). This factor increases to 14.3 for a lipase renewal every 6 months.

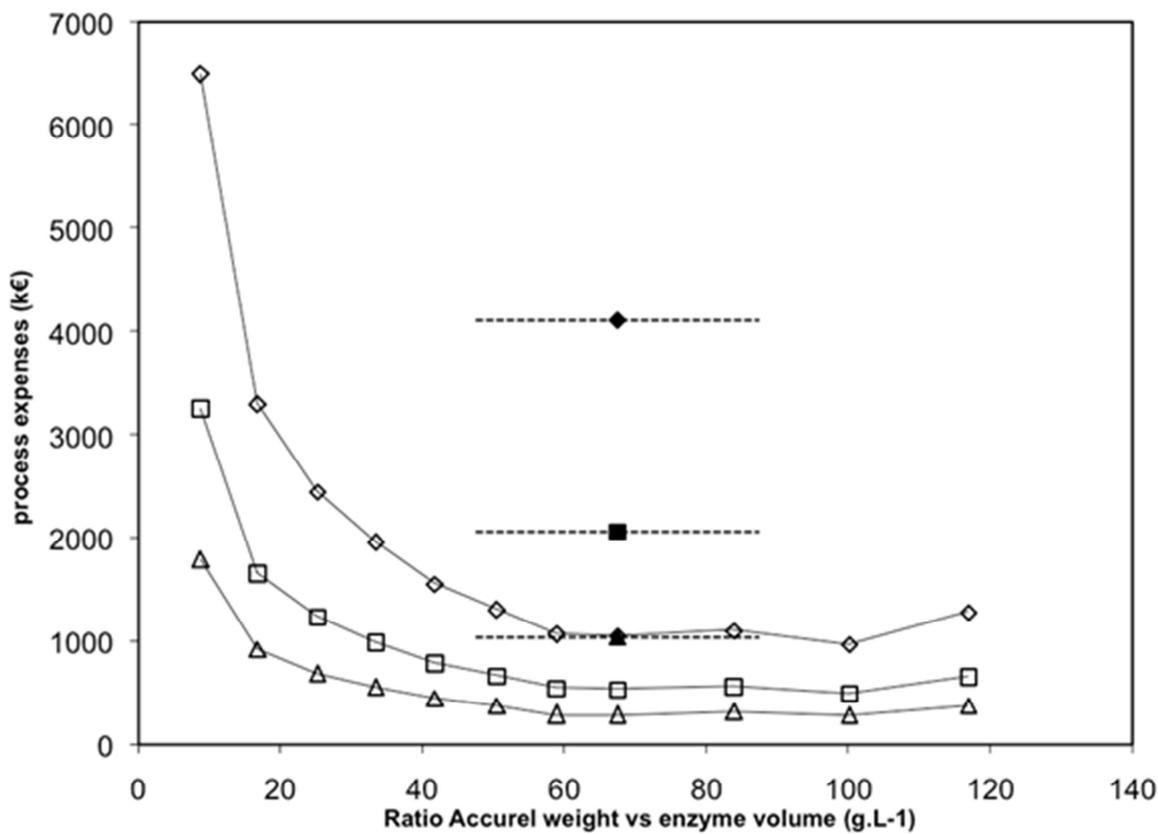


Figure IV.6-8 : Total reactor and enzyme cost optimisation for a butyl-oleate production of 10000 tons per year, for a process lifetime of 10 years with an enzyme renewal every 6 months (◇), 12 months (□) and 24 months (△). Filled symbols represent the expenses calculated for Novozyme 435® considering a stability of 6months (◆), 12months (■) and 24 months (▲).

Figure IV.6-8 presents the global costs as calculated with equation 17 for every quantity of Accurel used during immobilisation. Several scenarios in terms of enzyme stability were applied to calculation, from 6 to 24 months. A packed bed reactor for butanolysis of sunflower oil at lab scale and pilot plant scale was perfectly stable during 3 months with no change in conversion and no modification in product profiles <sup>[2]</sup>. In view of such stability, a biocatalyst replacement time of 6 months (and more) was considered as reasonable. In all cases, the shape of the respective curves is identical: the expenses are drastically decreasing

when the quantity of Accurel used for immobilisation is increased from 8 to 60g of Accurel /L of immobilisation medium, even if the corresponding volume of PBR is increased (see Table IV.6-1). After this point (60g/L), the decrease of lipase activity is not compensated for any longer by the price decrease and the high volume increase leads to an additional cost increase. The use of 60g of Accurel/L of immobilization medium in our conditions of immobilization turns out to be the best option to be considered in an industrial context. According to Figure 6, the corresponding immobilisation yield lies between 80 and 90%, which corresponds to a reasonable loss of lipase. Compared to Novozyme 435<sup>®</sup>, it represents a reduction of expenses of about 50% over 10 years, whatever the stability of the enzyme.

Thereby, the costs involved in the PBR only represent between less than 0.15% and 7% of the total costs. The design of an enzymatic process appears to depend almost only on the cost of the catalyst and the reactor costs have thus a very limited impact whatever its volume. Therefore, it is not necessary to develop the smallest reactor with the highest enzymatic activity but on the contrary, to find the enzyme allowing the lowest price whatever the reactor size.

If the principle of maximization of the process net present value is valid for any reactors, the three methodologies of capital cost estimate which were used in this study refer to range of reactor volumes developed for chemical industry i.e. large volumes. For smaller productions (reactors smaller than 100L), other methodologies have to be developed, notably in relationship with reactor manufacturers.

#### **IV.6.7 Conclusion**

CalB, one of lipases the most used in the industry, is only commercially immobilized on a medium hydrophobic support, the Lewatit VP OC 1600. For numerous applications, this support can be source of polar compound adsorption leading to a loss of lipase activity.

We have developed an immobilization system on a very hydrophobic support, the Accurel MP<sup>®</sup>. An economic evaluation of the global costs enables the ratio between the quantity of support and the quantity of enzyme used for immobilization to be optimized. From an economic point of view, the protein adsorption yield has to be maximized, even if the catalyst is less active and the reactor volume higher. The new immobilized enzyme enables to avoid glycerol (and other polar compounds) adsorption and would permit long-lasting continuous transesterification reactions.

### **Acknowledgements**

Work was financially supported by Syngenta Seeds SAS and the 'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie' (ANRT). The authors wish to thank Blandine Cuny for English corrections.

### **IV.6.8 References**

1. **Bouaid, A., J. Aparicio, M. Martínez, and J. Aracil.** *Synthesis of a green biosolvent: Isopropyl esters: A statistical approach.* *Enzyme. Microb. Technol.* (2007). 41: p. 533-538.
2. **Dossat, V., D. Combes, and A. Marty.** *Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent-free process.* *J. Biotechnol.* (2002). 97: p. 117-124.
3. **Knothe, G., J. van Gerpen, and J. Krahl.** *The biodiesel handbook:* AOCS press Champaign, IL 2005.
4. **Özgülsün, A., F. Karaosmanoglu, and M. Tüter.** *Esterification reaction of oleic acid with a fusel oil fraction for production of lubricating oil.* *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2000). 77: p. 105-109.
5. **Willing, A.** *Lubricants based on renewable resources - an environmentally compatible alternative to mineral oil products.* *Chemosphere* (2001). 43: p. 89-98.

6. **Parawira, W.** *Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review.* Crit. Rev. Biotechnol. (2009). 29: p. 82–93.
7. **Salis, A., M. Pinna, M. Monduzzi, and V. Solinas.** *Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis.* J. Biotechnol. (2005). 119: p. 291-299.
8. **Fjerbaek, L., K.V. Christensen, and B. Norddahl.** *A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification.* Biotechnol. Bioeng. (2009). 102: p. 1298-1315.
9. **Salis, A., M. Monduzzi, and V. Solinas.** *Use of lipases for the production of biodiesel,* in *Industrial Enzymes: structure, function and applications*, J. Polaina and A.P. MacCabe, Editors., Springer 2007. p. 317-339.
10. **Schmid, A., F. Hollmann, J.B. Park, and B. Bühler.** *The use of enzymes in the chemical industry in Europe.* Curr. Opin. Biotechnol. (2002). 13: p. 359-366.
11. **Jaeger, K.-E. and T. Eggert.** *Lipases for biotechnology.* Curr. Opin. Biotechnol. (2002). 13: p. 390-397.
12. **Bosley, J.A. and A.D. Peilow.** *Immobilization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading.* J. Am. Oil Chem. Soc. (1997). 74: p. 107-111.
13. **Du, W., Y. Xu, D. Liu, and J. Zeng.** *Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors.* Journal of molecular catalysis B: enzymatic (2004). 30: p. 125-129.
14. **Tischer, W. and F. Wedekind.** *Immobilized enzymes: methods and applications,* in *Biocatalysis - From Discovery to Application.* Springer 1999. p. 95-126.
15. **Brady, D. and J. Jordaan.** *Advances in enzyme immobilisation.* Biotechnol. Lett. (2009). 31: p. 1639-1650.
16. **Mateo, C., J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, and R. Fernandez-Lafuente.** *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.* Enzyme. Microb. Technol. (2007). 40: p. 1451-1463.
17. **Villeneuve, P., J.M. Muderhwa, J. Graille, and M.J. Haas.** *Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (2000). 9: p. 113-148.
18. **Gotor-Fernández, V., E. Busto, and V. Gotor.** *Candida antarctica lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds.* Adv. Synth. Catal. (2006). 348: p. 797-812.

19. **Zhang, H.Y., X. Wang, C.B. Ching, and J.C. Wu.** *Experimental optimization of enzymic kinetic resolution of racemic flurbiprofen.* *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2005). 42: p. 67.
20. **Varma, I.K., A.-C. Albertsson, R. Rajkhowa, and R.K. Srivastava.** *Enzyme catalyzed synthesis of polyesters.* *Progress in Polymer Science* (2005). 30: p. 949-981.
21. **Larios, A., H.S. Garcia, R.M. Oliart, and G. Valerio-Alfaro.** *Synthesis of flavor and fragrance esters using Candida antarctica lipase.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2004). 65: p. 373-376.
22. **Shimada, Y., Y. Watanabe, A. Sugihara, and Y. Tominaga.** *Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing.* *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2002). 17: p. 133-142.
23. **Watanabe, Y., Y. Shimada, A. Sugihara, and Y. Tominaga.** *Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor.* *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2001). 78: p. 703-707.
24. **Ognjanovic, N., D. Bezbradica, and Z. Knezevic-Jugovic.** *Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability.* *Bioresour. Technol.* (2009). 100: p. 5146-5154.
25. **Slotema, W.F., G. Sandoval, D. Guieysse, A.J.J. Straathof, and A. Marty.** *Economically pertinent continuous amide formation by direct lipase-catalyzed amidation with ammonia.* *Biotechnol. Bioeng.* (2003). 82: p. 664-669.
26. **Hills, G.** *Industrial use of lipases to produce fatty acid esters.* *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (2003). 105: p. 601-607.
27. **Royon, D., M. Daz, G. Ellenrieder, and S. Locatelli.** *Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent.* *Bioresour. Technol.* (2007). 98: p. 648-653.
28. **Chang, S.-W., J.-F. Shaw, C.-K. Yang, and C.-J. Shieh.** *Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor.* *Process Biochem.* (2007). 42: p. 1362-1366.
29. **Marty, A., V. Dossat, and J.S. Condoret.** *Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds.* *Biotechnol. Bioeng.* (1997). 56: p. 232-237.
30. **Dossat, V., D. Combes, and A. Marty.** *Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production.* *Enzyme. Microb. Technol.* (1999). 25: p. 194-200.

31. **Du, W., D. Liu, L. Li, and L. Dai.** *Mechanism exploration during lipase-mediated methanolysis of renewable oils for biodiesel production in a tert-butanol system.* Biotechnol. Prog. (2007). 23: p. 1087-1090.
32. **Bastida, A., P. Sabuquillo, P. Armisen, R. Fernández-Lafuente, J. Huguet, and J.M. Guisán.** *A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports.* Biotechnol. Bioeng. (1998). 58: p. 486-493.
33. **Fernandez-Lorente, G., Z. Cabrera, C. Godoy, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Palomo, and J.M. Guisan.** *Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties.* Process Biochem. (2008). 43: p. 1061-1067.
34. **Palomo, J.M., G. Muñoz, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, and J.M. Guisán.** *Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases.* J. Mol. Catal. B Enzym. (2002). 19-20: p. 279-286.
35. **Al-Duri, B. and Y.P. Yong.** *Characterisation of the equilibrium behaviour of lipase PS (from Pseudomonas) and lipolase 100L (from Humicola) onto Accurel EP100.* J. Mol. Catal. B Enzym. (1997). 3: p. 177-188.
36. **Al-Duri, B. and Y.P. Yong.** *Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports.* Biochem. Eng. J. (2000). 4: p. 207-215.
37. **Foresti, M.L. and M.L. Ferreira.** *Ethanol pretreatment effect and particle diameter issues on the adsorption of Candida rugosa lipase onto polypropylene powder.* Applied Surface Science (2004). 238: p. 86-90.
38. **Gitlesen, T., M. Bauer, and P. Adlercreutz.** *Adsorption of lipase on polypropylene powder.* Biochim. Biophys. Acta (1997). 1345: p. 188-196.
39. **Salis, A., E. Sanjust, V. Solinas, and M. Monduzzi.** *Characterisation of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation.* J. Mol. Catal. B Enzym. (2003). 24: p. 75-82.
40. **Quinn, D.M., K. Shirai, R.L. Jackson, and J.A.K. Harmony.** *Lipoprotein lipase-catalyzed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl esters. Inhibition by apolipoprotein C-II.* Biochemistry (1982). 21: p. 6872-6879.
41. **Fickers, P., J.M. Nicaud, J. Destain, and P. Thonart.** *Overproduction of lipase by Yarrowia lipolytica mutants.* Appl. Microbiol. Biotechnol. (2003). 63: p. 136-142.

42. **Langmuir, I.** *The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum.* J. Am. Oil Chem. Soc. (1918). 40: p. 1361-1403.
43. **Klamt, A.** *COSMO-RS: from quantum chemistry to fluid phase thermodynamics and drug design,* Amsterdam: Elsevier 2005.
44. **Lin, H.-Y. and S.-W. Tsai.** *Dynamic kinetic resolution of (R, S)-naproxen 2,2,2-trifluoroethyl ester via lipase-catalyzed hydrolysis in micro-aqueous isooctane.* J. Mol. Catal. B Enzym. (2003). 24-25: p. 111-120.
45. **Mei, Y., L. Miller, W. Gao, and R.A. Gross.** *Imaging the distribution and secondary structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy.* Biomacromolecules (2003). 4: p. 70-74.
46. **Chin, J.T., S.L. Wheeler, and A.M. Klivanov.** *On protein solubility in organic solvent.* Biotechnol. Bioeng. (1994). 44: p. 140-145.
47. **Oliveira, M.V., S.F. Rebocho, A.S. Ribeiro, E.A. Macedo, and J.M. Loureiro.** *Kinetic modelling of decyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalysed transesterification of vinyl acetate with decanol in supercritical carbon dioxide.* J. Supercrit. Fluids (2009). 50: p. 138-145.
48. **Sabbani, S., E. Hedenström, and O. Nordin.** *The enantioselectivity of Candida rugosa lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel.* J. Mol. Catal. B Enzym. (2006). 42: p. 1-9.
49. **Villermaux, J.** *Génie de la réaction chimique: conception et fonctionnement des réacteurs:* Tec et doc 1985.
50. **Turton, R., R.C. Bailie, W. Whiting, and J. Shaeiwitz.** *Analysis, synthesis and design of chemical processes.* 2nd Ed., Old Tappan: Prentice Hall 2003.
51. **Peters, M.S., K.D. Timmerhaus, and R.E. West.** *Plant design and economics for chemical engineers.* 4th Ed., New York McGraw-Hill Science/Engineering/Math 1991.
52. **Chauvel, A., G. Fournier, and C. Raimbault.** *Manuel d'évaluation économique des procédés.* Nouvelle édition revue et augmentée, Paris: Editions Technip, Publications de l'Institut Français du Pétrole 2001.
53. **Banque de France.** Last access: 2009; Available at: [http://www.banque-france.fr/fr/poli\\_mone/taux/html/2.htm](http://www.banque-france.fr/fr/poli_mone/taux/html/2.htm).
54. **Sandler, H.J. and E.T. Luckiewicz.** *Practical Process Engineering: A Working Approach to Plant Design,* Philadelphia, PA,: XIMIX 1993.

55. **Seider, W.D., J.D. Seader, and D.R. Lewin.** *Product and Process Design Principles: Synthesis, Analysis, and Evaluation*. Second Edition: Wiley 2004.

V : PUBLICATION N°4:

**PRODUCTION CONTINUE DE BIO-KEROZENE PAR ESTERIFICATION  
ENZYMATIQUE DES HUILES PRODUITS PAR LES  
MICROORGANISMES.**

---

---

Olivier Galy<sup>a</sup>, **Etienne Séverac**<sup>a</sup>, Yohann Allouche<sup>b</sup>, Pierre Monsan<sup>a</sup> & Alain Marty<sup>a\*</sup>.

---

a) 1) Université de Toulouse; INSA,UPS,INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077  
Toulouse, France

2) INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400  
Toulouse, France

3) CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

b) AIRBUS OPERATIONS; 316 Route de Bayonne F-31060 Toulouse, France

\* Correspondence : Alain Marty, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et  
Procédés, Institut National des Sciences Appliquées, 135 Avenue de Rangueil, 31077  
Toulouse Cedex4, France, Tel : +33 (0)5 61 55 94 39, Fax : +33 (0)5 61 55 94 00, Email :  
alain.marty@insa-toulouse.fr

---

---

En preparation.

*(Impact factor:)*

---

---

Titre Abrégé : Production de bio-kérosène par estérification continue.

## V.1 Résumé

Une seconde stratégie de production d'esters a été développée au cours d'un projet connexe de production d'esters ramifiés pour une application bio-kerosene. Les matières premières envisagées sont des huiles produites par microorganismes (*Yarrowia lipolytica*) qui contiennent 50% de triacylglycérols et 50% d'acides gras libres. Le contrôle des phénomènes de partition du glycérol et de l'eau conjoints est problématique. Ainsi, une stratégie en deux étapes (hydrolyse suivie d'une estérification des acides gras) a été considérée comme judicieuse.

Face à la difficulté de se procurer de telles huiles en quantité suffisante pour le développement d'un réacteur continu, il a été choisi de modéliser ces huiles en utilisant des huiles végétales. Le procédé est donc totalement transposable et correspond à l'optique de ces travaux de thèse. La première étape d'hydrolyse n'est pas abordée dans cet article, qui expose l'optimisation de la réaction d'estérification en réacteur à lit fixe. L'hydrolyse peut être réalisée efficacement par voie chimique ou par voie enzymatique. Plusieurs milieux réactionnels ont été envisagés pour contrôler la partition de l'eau entre milieu réactionnel et biocatalyseur et optimiser la réaction : présence d'un solvant plus ou moins polaire (butanone, *tert*-butanol, 2-méthyl-2butanol et diisopropyl ether) ou milieu sans-solvant.

L'analyse thermodynamique de ces systèmes réactionnels a été réalisée grâce au logiciel *CosmoTherm*. La modélisation de la solubilité de l'eau dans les milieux réactionnels finaux (100% de conversion) permet de déterminer les conditions limites dans lesquelles aucun phénomène de démixtion de l'eau n'intervient. A l'exception du diisopropyl ether qui peut être problématique aux concentrations les plus élevées, tous les systèmes réactionnels envisagés permettent la solubilisation complète de l'eau produite en cours de réaction. Pour le système sans solvant, un ratio molaire entre alcool et acides gras supérieur à 2,5 est

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

nécessaire. Les systèmes réactionnels envisagés sont donc performants pour une bonne évacuation de l'eau et assurer la stabilité opérationnelle du réacteur.

Le contrôle de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) est également un paramètre essentiel à contrôler. L' $a_w$  influe sur l'activité enzymatique et donc sur les quantités nécessaires d'enzyme pour assurer la production. Quelque soit le système réactionnel envisagé, l' $a_w$  est apparue d'autant plus importante que la concentration initiale en acide gras est élevée. Une concentration de 1 M semble être le meilleur compromis entre productivité, vitesse réactionnelle et conversion ; une telle concentration résulte en une  $a_w$  finale comprise entre 0,37 et 0,4 selon le système réactionnel.

Le milieu influence à la fois les vitesses catalytiques (effet de la polarité du milieu) et l'équilibre thermodynamique en faisant varier les activités thermodynamiques de chacun des composés entrant en jeu (substrats et produits). Les vitesses réactionnelles ont été mesurées en réacteur batch et le quotient K (l'activité de l'ester a été calculée pour différentes valeurs de conversion de 85% et 90%). De cette analyse, il ressort que le milieu sans solvant résulte en le plus faible quotient K (et correspondrait aux meilleurs rendements) tout en permettant une activité enzymatique raisonnable. Le milieu sans solvant a donc été retenu pour le développement d'un réacteur à lit fixe contenant 2g de Novozyme 435.

Les conditions optimales de fonctionnement ont été optimisées. Un débit d'alimentation de  $1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  et un rapport molaire entre *isobutanol* et acides gras de 3 permettent d'obtenir une conversion de 85% et une productivité de 129 tonnes par an et par kg de Novozyme 435. Cela représente une augmentation de productivité d'un facteur 9,3 par rapport à la productivité obtenue avec la réaction de transestérification. Ce réacteur a été stable pendant une période de 54 jours consécutifs.

Le rendement final en esters a pu être augmenté en mettant en œuvre un système de deux réacteurs en série, l'un contenant 2g de Novozyme 435, l'autre 1g et séparé par un système de

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

séparation de l'eau produite dans le 1<sup>er</sup> réacteur. Une conversion de 96% à 98% (selon la matière première) est ainsi obtenue. Dans ce cas, la productivité fut calculée à 100 tonnes d'ester par an et par kg de Novozyme 435. Une rapide analyse financière montre que les investissements liés au biocatalyseur représente de l'ordre de 1,5% du chiffre d'affaire généré par ce procédé.

**Mots clés:** Bio-kérosène, Novozyme 435, estérification, réacteur à lit fixe, thermodynamique, solubilité, activité de l'eau, productivité

**BIO-KEROSENE PRODUCTION BY CONTINUOUS LIPASE-CATALYZED  
ESTERIFICATION OF FATTY ACIDS FROM SINGLE CELL OIL.**

•

---

Olivier Galy<sup>a</sup>, **Etienne Séverac**<sup>a</sup>, Yohann Allouche<sup>b</sup>, Pierre Monsan<sup>a</sup> & Alain Marty<sup>a\*</sup>.

---

a) 1) Université de Toulouse; INSA,UPS,INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077  
Toulouse, France

2) INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400  
Toulouse, France

3) CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

b) AIRBUS OPERATIONS; 316 Route de Bayonne F-31060 Toulouse, France

\* Correspondence : Alain Marty, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés, Institut National des Sciences Appliquées, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex4, France, Tel : +33 (0)5 61 55 94 39, Fax : +33 (0)5 61 55 94 00, Email : [alain.marty@insa-toulouse.fr](mailto:alain.marty@insa-toulouse.fr)

In preparation.

*(Impact factor:)*

---

Abbreviated title: Production of bio-kerosene by continuous esterification

## **V.2 Abstract.**

Production of *isobutyl* or *isoamyl* esters by continuous lipase-catalyzed esterification of fatty acids resulting from the hydrolysis of lipids produced by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* was optimized for a biokerosene application. Different solvents and a solvent free system (SFS) were tested as reaction medium, using *Cosmo<sup>therm</sup>* software to maximize the rate, conversion at equilibrium, productivity, and reactor stability. The SFS was shown to be the best medium and had the advantage of being green. This system was consequently used to optimize a continuous process with a packed bed reactor of Novozyme 435, which was shown efficient whatever the fatty acid used. Microbial fatty acids were efficiently (97%) converted in esters, with a high productivity of 100 tons per year and per kg of enzyme. The reactor was perfectly stable over a period of 54 days and enzyme represents only 1.4% of the cost of production of the biokerosene.

**Keywords: Biokerosene, Biodiesel, Esterification, Novozyme 435, Packed bed reactor, Microbial oils.**

### **V.3 Introduction**

As petroleum resources dwindle, the renewable exploitation of carbon for the production of energetic biomolecules is a great challenge. A further major challenge in the coming years is reducing greenhouse gas emissions. The aerospace domain is particularly concerned by these two issues. The kerosene produced for aviation represents about 5.9% of the oil refined worldwide and 12% of the fuel used for transport [1]. As a result, kerosene is an increasingly important target for biofuel. Although diesel can be replaced or supplemented by methyl or ethyl esters from vegetable oils, kerosene is 100% the product of atmospheric distillation of petroleum. So far, only a few studies have described molecules that could be used to replace or complement kerosene, and the only molecules tested are produced by energy consuming processes with a negative CO<sub>2</sub> balance: GTL (the gas to liquid process from coal) or products of the Fischer Tropsch reaction [2]. Among potential targets that can be prepared from renewable feedstocks, fatty acid alkyl esters (FAAE) are promising molecules [3].

At present, the limitation of the traditional production of fatty acids from plant oils is competition with the food industry [4]. Consequently, the production of fatty acids by microorganisms through the accumulation of triacylglycerols (TAG) from carbohydrate substrates is thus an attractive alternative [5]. It has major advantages such as the possibility of controlling and modulating the fatty acid profile by combining fermentation strategies and the construction of genetically modified strains [5]. The overall cost of the biofuel process could be reduced by recycling the main by-products of the biodiesel industry (particularly glycerol) as substrates for the microorganism [6]. Finally, the high quantitative and qualitative reproducibility of the microbial processes is attractive compared to the cultivation of plants, which may be affected by climate changes and diseases.

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

Among micro-organisms such as yeasts, green algae and oleaginous prokaryotes, yeasts are the best target for oil production as they provide the best performances in terms of biomass production, maximum lipid content and volume productivity [5]. The good knowledge of yeast physiology and genetics makes it possible to engineer strains to control the FA composition in terms of chain length, insaturation level, ramification degree or hydroxylation. Previous studies in our laboratory in collaboration with Airbus showed that the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* is a good candidate for biokerosene production [7]. In nutrient limiting conditions, *Y. lipolytica* accumulated lipids up to 44% (w/w) of their biomass, at a lipid production rate of  $0.31 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$  [7]. The specificity of the oil produced by *Y. lipolytica* is the accumulation of an equimolar mixture of triglycerides and free fatty acids. The main fatty acids are palmitic acid (11%), oleic acid (28%) and linoleic acid (51%) [7].

Aircraft fuels are much more specific and involve stricter technical constraints than fuels for any other civilian transport device. Indeed, some fuel properties are mandatory (freezing point below  $-47 \text{ }^{\circ}\text{C}$  to ensure high altitude flight capabilities, sufficiently high thermal stability to ensure engine cooling capability). Consequently TAG needs to be transformed into esters to lower the freezing point and decrease viscosity. The optimal freezing temperature of oleic acid esters with a linear alcohol is obtained with a butyl ester ( $-35.7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [8]. Branched esters, obtained with secondary alcohols (2-propanol and 2-butanol) or ramified alcohols have lower freezing points than their linear equivalent.

Valorisation of oils by alcoholic trans-esterification or esterification using lipases (formally called triacylglycerol acylhydrolases EC.3.1.1.3) has been extensively studied in recent years [9-12]. But despite the great potential of -and the great interest in- enzymatic catalysis, industrial FAAE production processes involving lipases are still very limited. The main

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

challenge of such processes is minimising the cost of the lipase by developing long-lasting continuous production processes, in which the lipase does not need to be replaced for weeks, months or even longer [13-14]. In biocatalysis, controlling the partition of the polar reaction products and co-products between the reaction medium and the enzyme support is the most important [15-16]. Adsorption of polar compounds like water or glycerol onto the enzyme support limits diffusion, which, in turn seriously affects the stability of packed-bed reactors by reducing the access of hydrophobic substrates to the enzyme active site [13, 15-16]. In the case of *Y. lipolytica* oil comprising an equimolar mixture of triglycerides and free fatty acids, it would be difficult to control both water and glycerol production. The best way would thus be first to hydrolyze the oil, then to recover glycerol and free fatty acids and then, in the second step, to convert free fatty acids into esters.

The objective of the present study was to develop a continuous enzymatic process for the esterification of free fatty acids to produce biokerosene. To minimise the freezing point of the resulting esters, two branched alcohols were tested: *isobutyl* alcohol (2-methyl-1-propanol) and *isoamyl* alcohol (3-methyl-1-butanol). At the same time, a mixture of oleic acid and linoleic acid was used to mimic the composition of the hydrolysed oil produced by *Y. lipolytica*. A second set of experiments was conducted to mimic the alkanes present in kerosene, using short fatty acids (C10, C12 and C14). The production of these specific fatty acids with *Y. lipolytica* is currently under development in our laboratory. The reaction medium will be optimised to obtain a compromise between initial rate, conversion at thermodynamic equilibrium, and the stability of the continuous reactor.

## **V.4 Material and methods**

### **V.4.1 Material**

Commercial immobilized lipase B from *Candida antarctica*, (Novozyme 435) was a gift from Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). Oleic acid (technical grade 90%), pure grade >99% fatty acids, reactive alcohols (pure grade >99%): 2-methyl-propanol (*isobutyl* alcohol), 3-methyl butanol (*isoamyl* alcohol), methanol and ethanol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other chemicals and solvents were of the highest purity and were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). All reactants were dehydrated and stored with activated 3Å molecular sieves purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **V.4.2 Batch reactions**

Batch reactions were carried out in 7 ml teflon capped glass tubes under magnetic stirring (250 rpm) at controlled temperature (60 °C). The reaction mixture consisted in different amounts of technical grade OA (from 100 mM to 1500 mM), and different amounts of alcohols (alcohol:OA molar ratio from 1 to 20). Reactions were started by adding the immobilized enzyme (10 mg.ml<sup>-1</sup> of reaction). Reactions were performed with or without solvent. At specified times, 100 µl samples were taken in the reaction medium. The reactions were stopped by centrifugation at 13 500 rpm for 2 minutes using an Eppendorf 5415D Centrifuge. The supernatant was subjected to HPLC analysis.

### **V.4.3 Continuous reaction in packed bed reactor**

The reactor was a fixed-bed type. It consisted of a column (10 mm in diameter), maintained at a temperature of 60°C containing 2 g of Novozyme 435. The reaction medium containing

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

oleic acid (with concentrations ranging from 500 mM to 1500 mM) and *isobutanol* (at different alcohol:OA molar ratios) previously dried with activated molecular sieve, was pumped using an ISO-3100SD Isocratic Pump (Dionex, USA) thus percolating the enzyme through the packed bed. At specified times, samples (1 ml) were recovered from the outflow for HPLC analysis.

### V.4.4 Medium dehydration

Water removal from the reaction medium was tested using several discontinuous approaches.

1. Water and alcohol were completely evaporated under vacuum (60 °C/10 mbar). Ester and unreacted FA were then recovered and alcohol added in order to reconstitute the appropriate amount of medium. 2. The reaction medium was incubated with an activated molecular sieve overnight in order to adsorb the produced water.

Water was then continuously removed using a 150 ml glass column (3 cm in diameter) scattered with about 30 glass deflectors. The column was connected in series between two packed reactors. The first reactor (2 g of Novozyme 435) fed the dehydration system through the side of the upper part of the column. The reaction mix was recovered from the lower part of the column through a tap, and pumped into a second reactor (1 g of Novozyme 435) with an isocratic pump (ISO-3100SD, Dionex, USA). Two sintered glass discs (1 cm in diameter) formed the base of the two columns. The bases were connected to a gas tubing system (nitrogen network with controlled flow). When the system was operating, gas was bubbled into the column, where it circulated against the current of the reaction mix and was recovered at the top of the column. The dehydrated medium was used to feed a second reactor containing 1 g of Novozyme 435 in the same conditions as described above.

#### **V.4.5 Analytical method**

Analysis was performed using a Dionex Ultimate 3000 HPLC system, equipped with a Shodex RI-101 Refractive Index Detector (Showa Denko Europe, GmbH, Munich, Germany) and a Zorbax SB-C18 Column (4.6 mm x 250 mm x 5 µm) (Agilent technologies, Santa Clara, USA). Elution was carried out at 40 °C isocratically with methanol + 1% v/v acetic acid as mobile phase and a flow rate of 0.5 ml.min<sup>-1</sup>, and the 20 µL samples were then analyzed. Detection was performed at 40 °C. Calibration was carried out with pure standards.

#### **V.4.6 Water activity and water concentration measurement**

Before use, immobilised Novozyme 435 was equilibrated with activated molecular sieve to reduce water activity at 0.1. Water activity was determined with Humidat IC II (Novosina, Switzerland) calibrated with saturated salt solutions (LiCl aw=0.113; Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> aw=0.529; KCl aw=0.936) [17]. Water concentration in the reaction media was determined using a Karl Fisher 701 KF Titrino (Metrohm, Switzerland).

### **V.5 Results and Discussion**

#### **V.5.1 Choice of solvent**

The lack of a fully functional enzymatic industrial process is mainly due to the failure to absorb the cost of the enzyme in the process, meaning this process cannot compete with chemical catalysis. So to use an enzymatic process at industrial scale, the price of the enzyme has to be reduced by optimisation of a continuous system which remains stable over a long period of time.

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

The stability of the immobilised enzyme is a key factor in the economic feasibility of a continuous process. It can be achieved by the correct control of the operating conditions (temperature, pH, etc.) but also through the choice of a solvent system which can solubilise and then evacuate the water generated by fatty acid esterification. In this case, it is necessary to maintain water activity at the optimal value depending on the enzyme concerned (Colombié et al., 1998). When selecting the solvent, hazardous solvents and solvents with a boiling point (BP) that did not agree with our enzyme operating conditions were excluded. A first set of solvents with logP values ranging from 0.29 to 1.52, was selected: butanone (logP=0.29, BP=79 °C), tert-butanol (logP=0.35, BP=82 °C), 2-methyl-2-butanol (logP=0.89, BP =102 °C) and diisopropyl ether (logP=1.52, BP=69 °C). A solvent free system (SFS), solely composed of the mixture of reactants, with *Isobutanol* (LogP=0.75, BP=108) playing the role of reactant and solvent, was also considered. Upgrading an efficient solvent free system in terms of kinetics, conversion, and stability, enables optimisation of volume productivity, simplification of downstream processing and easier recovery of alcohol for recycling in a biorefinery approach.

### V.5.1.1 The Modelling approach

The COSMO-RS method has already been used to calculate the solubility of water, and the thermodynamic activities of reactants in different reaction conditions (different solvents and initial concentrations of the two reactants). COSMO-RS is based on a semi-conductor like model [19]. In contrast to group contribution methods, which are based on experimental data, COSMO-RS calculates the thermodynamic data from the molecular surface polarity distributions resulting from quantum chemical calculations of the individual compounds in complex mixtures [20]. Quantum calculations were performed using Turbomole software.

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

Esterification of oleic acid (OA) with *isobutanol* at 60 °C was chosen as a model reaction, after checking that the enzyme, Novozyme 435, presents the same activity towards palmitic, oleic, and linoleic acids (the main fatty acids present in *Y. lipolytica* oil) (data not shown). Three molar ratios between alcohol and fatty acids (1, 2 and 3) were tested and two concentrations of fatty acids were chosen (1 and 1.5 M) to ensure high productivity and to be able to observe the influence of solvent polarity. Indeed, at an oleic acid concentration of 1 M, the proportion of the solvent represented 59%, 50% and 40% of the reaction volume for alcohol:acid ratios of 1, 2 and 3 respectively; and 39%, 25% and 11% for an initial oleic acid concentration ( $OA_i$ ) of 1.5 M.

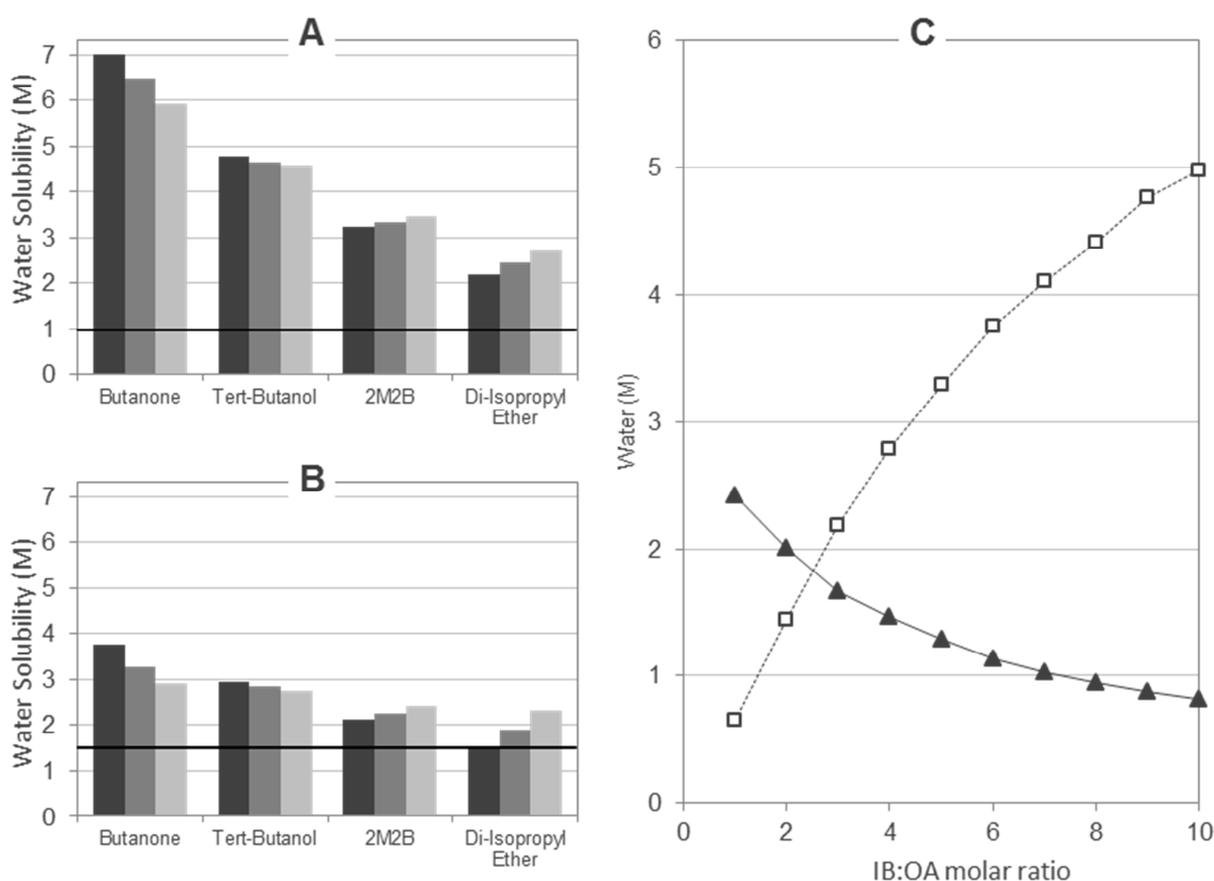
### V.5.1.1.1 Modelling water solubility

Computing water solubility makes possible to quantify the risk of phase separation. For all the media tested, water solubility decreased as the reaction advanced (from 6% to 20% between 0% and 100% conversion, depending on the ratio,  $OA_i$  and the solvent used) (data not shown). Its solubility is a consequence of the decrease in medium polarity due to alcohol consumption and the replacement of fatty acid molecules by the more hydrophobic ester molecules. Therefore the critical point is the reaction end point when the production of water reaches maximum. For this reason, only 100% conversion was considered when presenting the results. Figure V.5-1 shows calculated solubility calculations for the different solvents.

All the solvents were able to solubilize the water produced by the reaction. The only limit was encountered with the use of diisopropyl ether with an  $OA_i$  of 1.5 M and a ratio of 1. At an  $OA_i$  of 1.5 M, the difference between solvents was less marked due to the low volume of solvent present in the system. Changes in water solubility in the different solvents were correlated with the polarity of the solvents. For a given solvent, the effect of the molar ratio of

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

alcohol to fatty acids on water solubility was low. Increasing this ratio was not favourable for the two more polar solvents, due to the replacement of the solvent by a more hydrophobic molecule, alcohol. The opposite phenomenon was observed in the case of the two more hydrophobic solvents. This is in agreement with the fact that the *isobutanol* LogP ( $\text{LogP}_{\text{isobutanol}} = 0.75$ ) lies between the LopP of the two sets of solvents.



**Figure V.5-1: Computed water solubility in the reaction media at 100% conversion at 60 °C with OAi = 1 M (A) or 1.5 M (B) and three initial IB:OA ratios, Ratio = 1 (black bar), R = 2 (gray bar) and R = 3 (light gray bar). The black line represents the water concentration generated by the reaction. Solvents are ranked based on their increasing polarity index. In solvent-free system (C), computed water solubility (□) and theoretical water concentrations produced (▲) were represented in reaction media at 100% conversion according to IB/OAi molar ratios.**

In the solvent-free system, the concentrations of oleic acid and alcohol are interdependent. Water solubility was calculated with an alcohol:acid ratio ranging from 1 to 10. Figure V.5-1-C shows model results compared with the theoretical water concentration produced at 100% conversion. The water produced was fully solubilised into the medium at ratios above 2.5. At lower ratios, the phases are likely to separate at 100% conversion, which could be a problem in a continuous reactor.

### V.5.1.1.2 Modeling water thermodynamic activity

Water solubility is not sufficient to predict the performance of the reactor. Indeed, enzyme activity and conversion at thermodynamic equilibrium are tightly linked to water activity in the enzyme's environment. The optimal water activity for *Candida antarctica* Lipase B immobilized on polypropylene is 0.1 [21]. Given that the nature of the support has only a minor influence on optimal  $a_w$  [22], Novozyme 435 can be assumed to have the same range of optimal  $a_w$ .

Figure V.5-2-A shows water activities in the different reaction media as a function of the stage of advancement of the reaction at three different initial concentrations of oleic acid ( $OA_i$  0.5 M, 1 M and 1.5 M) and for an initial IB:OA molar ratio of 3 calculated at 60 °C. For the SFS esterification reaction, three IB:OA molar ratios were used for the model to obtain similar  $OA_i$  concentrations as for the other solvent systems (Figure V.5-2-B). This implied molar ratios of 18.3, 7.4 and 3.8 respectively and enabled the comparison of performances in terms of volume productivity between SFS and other solvent systems. For an  $OA_i$  of 0.5 M, water activity did not exceed 0.2 at 100% conversion, except for the most hydrophobic solvent, diisopropyl ether. At 1 M, water activity ranged between 0.37 and 0.43 depending on

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

the solvent (0.57 for diisopropyl ether). At 1.5 M, variation in  $a_w$  between solvents was lower (ranging from 0.71 to 0.8). Indeed, at this high  $O_{Ai}$ , the influence of the solvent was reduced as it represented only 11% of the reaction volume. Surprisingly, *tert*-butanol reduced  $a_w$  more efficiently than butanone in contrast to the differences observed in  $\log P$ . This could be due to the aprotic character of butanone compared to alcohols.

In a plug flow reactor, water is partitioned between the reaction medium and the enzymatic support.  $a_w$  values increase along the reactor length. At steady state, the water activity of the enzymatic support is in equilibrium with the activity of the liquid phase. In other words, enzyme activity will decrease following the pattern of increase in  $a_w$ .

From a kinetic point of view, it is thus necessary to find a compromise between productivity and the activity of the enzyme and consequently between productivity and the quantity of the enzyme.

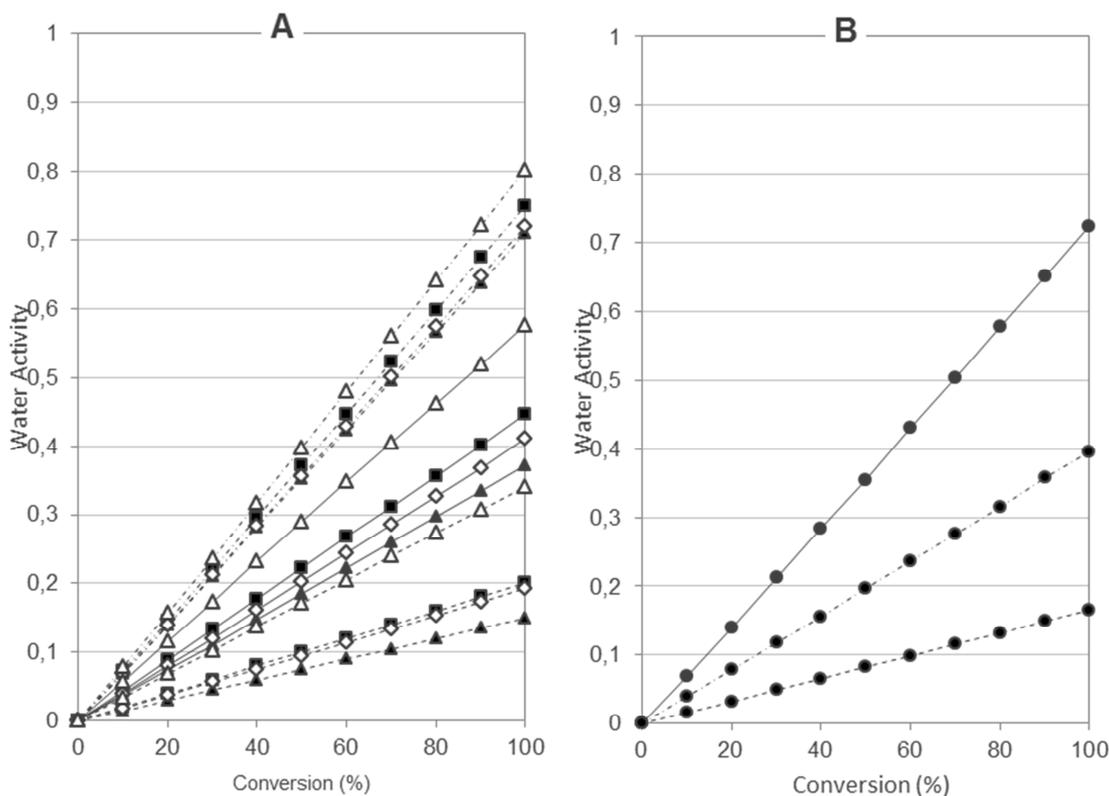


Figure V.5-2: Variations in  $a_w$  in the reaction medium as a function of the stage of advancement of the reaction (with 10% of conversion increments) in solvent systems (A) or solvent free-system (B). For solvent systems,  $a_w$  values were modelled for butanone ( $\diamond$ ), tert-butanol ( $\blacktriangle$ ), 2M2B ( $\blacksquare$ ) and diisopropyl ether ( $\triangle$ ) for  $OA_i=0.5$  M (dashed line), 1 M (black line) and 1.5 M (dot-dashed line) with a constant initial IB/OA molar of 3. For solvent-free system  $a_w$  values were modelled for three IB: $OA_i$  molar ratios: 3:8 ( $\bullet$  & dashed line), 7:4 ( $\bullet$  & black line) and 18:3 ( $\bullet$  & dot-dashed line) corresponding to  $OA_i$  of 1.5 M, 1 M and 0.5 M respectively.

The use of an  $OA_i$  of 1.5 M was too high to maintain efficient enzyme activity (water activity being between 0.71 and 0.8 at 100% conversion). At this value, enzyme activity was less than 10% of optimal enzyme activity [23]. An  $OA_i$  of 1 M appeared to be a good compromise, with a final  $a_w$  varying between 0.37 and 0.44 depending on the system (diisopropyl ether being discarded), associated with a low  $a_w$  and with good volume productivity. At this value, enzyme activity was 50% of optimal activity. It should be noted that high volume productivities are associated with high  $a_w$  values. This phenomenon is a further justification

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

for the use of a plug flow reactor rather than a stirred tank reactor, in which  $a_w$  will be at this maximum value inside the reactor.

Water activities obtained in solvent-free systems were of the same order of magnitude as those obtained in the presence of solvents (0.71, 0.4 and 0.17 for  $OA_i$  of 1.5, 1 and 0.5 M respectively) (Figure V.5-2-B)

### V.5.1.1.3 Thermodynamic activities of reactants and thermodynamic equilibrium

The activities of all the reactants in the reaction medium will influence the reaction equilibrium. OA and *isobutanol* activities ( $a_{OA}$  and  $a_{alc}$  respectively) have to be as low as possible, whereas water and ester activities ( $a_{ester}$ ), have to be as high as possible to maintain the ratio K (Eq. V-1) under the equilibrium constant  $K_{eq}$ .

$$K = \frac{a_{ester} \cdot a_w}{a_{OA} \cdot a_{alc}} \quad (\text{Eq. V-2})$$

The value of K was calculated in the different solvents for different initial substrate concentrations (0.5, 1 and 1.5 M), and as a function of the conversion (Figure V.5-3 In presence of solvents, an IB:OA<sub>i</sub> ratio of 3 was selected, and for SFS the ratio differed according to OA<sub>i</sub> (ratio of 18.3, 7.4 and 3.8 corresponding to OA<sub>i</sub> = 0.5, 1.0 and 1.5 M respectively). This strategy was chosen so productivity could be compared. Whatever the ratio and the conversion, butanone gave the highest K value, even if the polarity of this solvent reduces water activity (3 times compared to the more hydrophobic solvent diisopropyl ether). This positive effect is largely balanced by an increase in ester activity and a decrease in alcohol activity (data not shown). Water and alcohol activities were the highest in diisopropyl ether, while acid and ester activities were the lowest, the balance is consequently less positive. 2M2B and *tert*-butanol led to almost the same K value in all the conditions tested. Variations in water and alcohol activity were balanced by variations in oleic acid and ester activity.

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

A solvent-free system appeared to be the best reaction medium to reduce the K value. A solvent-free system makes it possible to maximise acid activity and to minimise ester activity. From the point of view of water activity, only butanone and *tert*-butanol were shown to be better than SFS. The main positive influence on K is the large positive increase in alcohol activity due to a higher ratio caused by the absence of solvent.

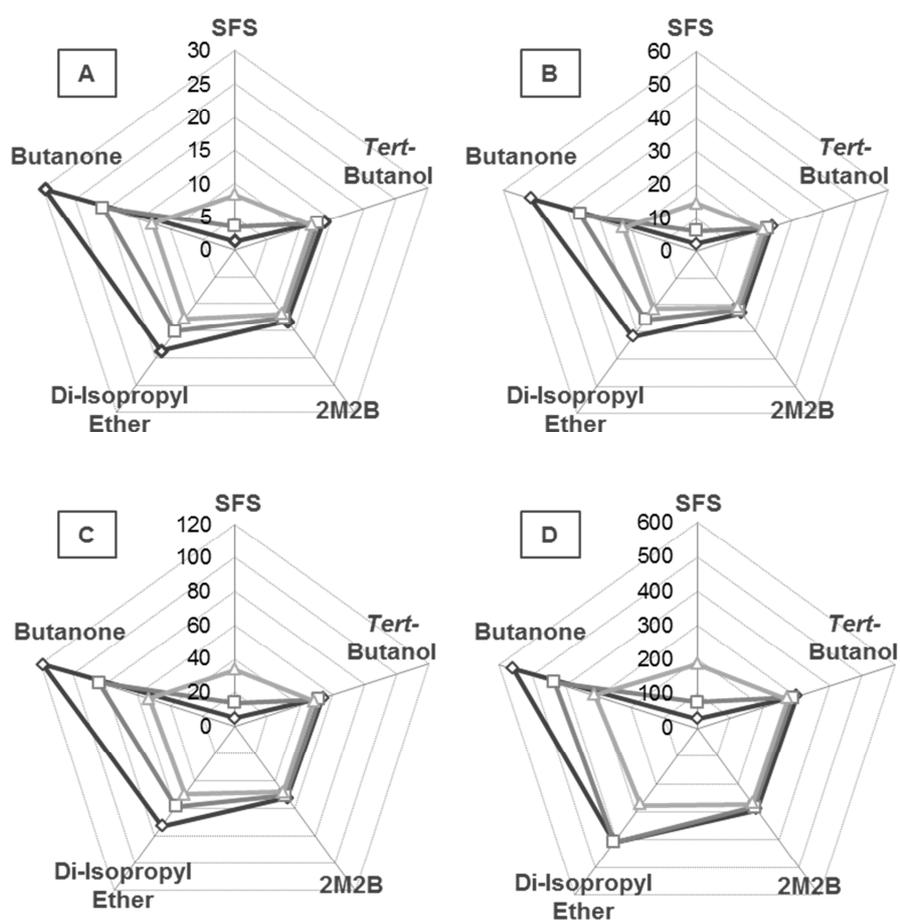


Figure V.5-3: Comparison of K values calculated from modeled activities at hypothetical conversions of 85% (A), 90% (B) at 60 °C. For calculations in presence of solvent, OA<sub>i</sub> 0.5 M (◇), 1 M (□) and 1.5 M (△) and an IB:OA<sub>i</sub> molar ratio of 3 were selected. For the solvent-free system, OA<sub>i</sub> = 0.5 M, 1 M and 1.5 M, corresponding respectively to IB:OA<sub>i</sub> molar ratios of 3.8, of 7.4, and of 18.3 were selected.

V.5.1.2 Experimental comparison of solvent

To support the modelling approach, we decided to experimentally measure initial reaction rates and the thermodynamic equilibrium in batch reactors with an initial oleic acid concentration of  $OA_i = 1$  M and an IB/OA molar ratio of 3 in solvent systems and of 7.4 in the solvent-free system (table 1). Initial water activities of both the enzymatic support and the reaction media were adjusted using an activated molecular sieve to a value of 0.03. From the point of view of kinetics, the higher the solvent polarity, the lower the activity. These results are in agreement with data published by Sandoval et al. (2001) [24], who underlined the fact that, apart from thermodynamic effects, the polarity of the solvent has a direct influence on the activity of the enzyme. For instance, at the extremes, activity in butanone was only 19% of activity in diisopropyl ether. In SFS, activity was the same that observed in 2M2B: 810  $\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  of enzyme (70% of that observed in diisopropyl ether).

From the point of view of conversion at thermodynamic equilibrium, as predicted by the calculation of the K value, solvent free appeared to be the best system, as it led to 95.3% conversion. Even if the polarity of Tert-butanol, 2M2B and di-isopropyl ether differed considerably, they produced similar results, around 88% of conversion. Only the behaviour of butanone was not very well predicted. K modelling showed it to be the worst solvent, whereas experimentally, it appeared to be the best.

In theory, if the  $K_{eq}$  constant is calculated using thermodynamic activities instead of concentrations, it does not depend on the reaction medium. The predicted  $K_{eq}$  was relatively constant (18.5 +/- 19%) except for butanone whose  $K_{eq}$  was significantly higher than in other solvents.

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

**Table V.5-1: Initial rates and steady-state conversion of esterification batch reaction of OA by IB. Reaction conditions: volume 3 ml, 1M OA; IB:OA molar ratio 3 (ratio 7.4 for SFS) at 25 °C, under continuous stirring at 1000 rpm. Initial water activity of the enzyme and the solvent were fixed at 0.03.  $a_w$  and  $K_{eq}$  activity values were calculated using the activities modelled for each reaction component at experimental steady state.**

	<i>Tert-</i>				
	Butanone	Butanol	SFS	2M2B	DIPE
<b>Initial rate</b>					
<b><math>\mu</math> mole Ester/ min / g Novozyme 435</b>	220	640	810	810	1150
<b>Conversion at steady state (%)</b>	91.3	87.6	95.3	87.0	88.9
<b><math>K_{eq}</math> in activity</b>	36.3	17.2	17.4	15.8	23.8

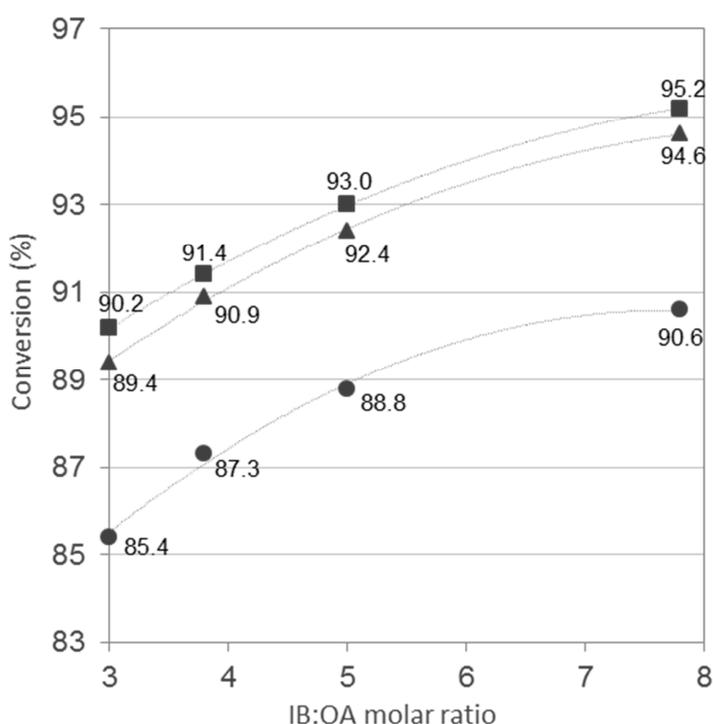
At the end of the modelling study and of the experimental part, the solvent-free system appeared to be the best compromise both from a kinetic and thermodynamic point of view. In addition, the SFS will lead to the best volume productivity and the fact it is green is undoubtedly a further advantage. For all these reasons, we decided to optimise a continuous plug flow reactor with a SFS.

### V.5.2 Development of an optimal continuous plug flow reactor

As underlined above, the ratio between the two substrates, oleic acid and *isobutanol*, has a major influence on both the kinetics and the conversion obtained at equilibrium. This parameter was then tested in a range from 3 to 7.8, corresponding to an initial oleic concentration ranging from 1 to 1.7 M (Figure V.5-4). For each ratio, three flow rates were tested, 0.1, 0.5 and 1 mL.min<sup>-1</sup>. This range was chosen based on the similarity between a batch and a plug flow reactor (data not shown), which was obviously pertinent. For instance,

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

at a ratio of 7.8 (1 M oleic acid), the maximum conversion (95.2%) obtained in the batch system (table 1) was achieved with a flow rate of 0.1 mL.min<sup>-1</sup>. A five-fold higher flow rate made it possible to reach 99.4% of this maximum value. Finally, a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup> led to 95% of this maximum value. To maximise productivity, the 1 mL.min<sup>-1</sup> flow rate was selected for further optimisation.

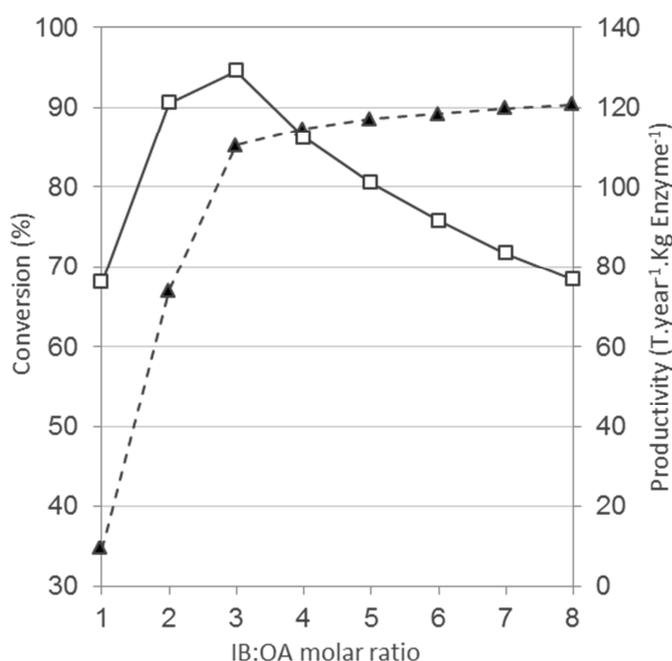


**Figure V.5-4 : Influence of the IB:OA molar ratio on continuous conversion of OA in SFS at flow rates of 1 mL.min<sup>-1</sup> (■), 0.5 mL.min<sup>-1</sup>(▲) and 0.1 mL.min<sup>-1</sup>(●). Operating conditions: packed bed reactor containing 2 g of Novozyme 435, temperature: 60 °C.**

Not surprisingly, an increase in the molar ratio led to an improvement in conversion. A shift in the ratio from 3 to 7.8 increased conversion by approximately 5 points whatever the flow rate used. The use of high IB:OA ratios, even if associated with higher conversion rates, had the disadvantage of dramatically reducing volume productivity (Figure V.5-5). IB:OA ratios

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

of between 2 and 3 led to the best volume productivity, exceeding the 129 tons of esters per year and per Kg of enzyme. With this ratio, the performance of the reactor decreased dramatically. In this case, water phase separation occurred, as predicted by solubility modelling. A molar ratio of 3 appeared to be the best compromise between volume productivity (129.3 tons of ester produced per year and per Kg of enzyme) and the conversion rate (85%).



**Figure V.5-5 : Conversion measured in the reactor outflow (▲) and pure ester productivity (□) vs. IB:OAi molar ratio. Operating conditions: packed bed reactor containing 2 g of Novozyme 435, flow rate: 1 ml.min<sup>-1</sup>, temperature: 60°C.**

In these operating conditions (1.7 M OAi, ratio 3, 1 mL.min<sup>-1</sup> flow rate, 2 g of enzyme, -60 °C), no decrease in reactor performance was observed over a period of 54 days. Our experiment, consolidated by previous studies [25], suggests that the lifetime of a packed-bed reactor using a stable enzyme like Novozyme 435, operated in our optimized conditions, is at least a year. In particular, this was possible due to perfect control of water activity inside the

reactor, a solvent-free system enabling the water produced by the reaction to be evacuated in the outflow, even at a very high substrate concentration (1.7 M).

### **V.5.3 Process optimisation**

To improve the conversion of the fatty acid at the process outflow, and hence the purity of the ester, we investigated the possibility of combining two plug flow reactors separated by a system that made it possible to decrease water activity in the flow into the second reactor. The first reactor corresponded to the previously optimised one containing 2 g of enzymes and fed with a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup>. In these conditions 85.4% conversion was achieved. The possibility of shifting the equilibrium by removing water removal became apparent. We explored the feasibility of this dehydration strategy using two discontinuous methods (i) using a molecular sieve able to capture the water produced in the first reactor; (ii) complete evaporation of water and un-reacted alcohol followed by reconstitution of the medium. A continuous method using an intermediate dehydrating column and continuous nitrogen stripping was developed. The dehydrated medium obtained using these three methods was sent to a second reactor filled with Novozyme 435, to conclude the esterification process. The quantity of enzyme (1 g) in the second reactor was optimised (data not shown). A final conversion rate of 98% was achieved whatever the method used for water removal.

### **V.5.4 Versatility of the developed enzymatic process**

To extend the application scope of the conversion process to the production of new FAAE targets, new esters were produced using another source of FA (linoleic acid (C18:1), myristic acid (C14), lauric acid (C12) and decanoic acid (C10)) with *isobutanol* or *isoamyl* alcohol as a source of alcohol. These experiments confirmed that the FA originally present in microbial oil

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

could be entirely converted into FAAE, and that it was possible to produce a second generation type FAAE comprised of short FA residues.

The previously used operating conditions (alcohol:FA molar ratio of 3, flow rate of 1 ml/min, 60 °C, dehydration using a molecular sieve or a dehydration column) were applied and enabled the production of nine new combinations of FAAE. For the production of FAAE from myristic acid, it should be noted that we had to pre-warm the input to 60 °C to prevent solidification of the reaction medium at ambient temperature. Performances observed with the new FAAE were the same as those obtained with *isobutyl-oleate*, confirming the versatility of the proposed enzymatic process (Table V.5-2). ).

Finally, we used the enzymatic process we developed to esterify the oil produced by the yeast *Y. lipolytica*, after its complete hydrolysis into fatty acids. The fatty acid mixture mainly comprised palmitic acid (11%), oleic acid (28%) and linoleic acid (51%). The performances were exactly the same as those observed with pure fatty acids, i.e. 97 tons of isobutyl esters (100 tons of *isoamyl* esters) produced per year and per kg of enzyme with a conversion rate of 97% at the outflow of the second reactor.

We made a cost projection for FAAE production at industrial scale based on the process described in this paper. About 1 ton of enzyme would be required for the production of 100 000 tons of ester per year in 365 working days. Considering a sales price of about 0.75€/Kg for kerosene, the price of Novozyme 435 being 1100€/Kg (with a one-year lifetime), the production of ester would generate 1.1 M€ and the price of enzyme would account for 1.4% of the sales price

## V. Production de bio-kérosène par estérification continue.

**Table V.5-2: Conversion obtained with the production of first and second generation FFAE. Operating conditions: Conversion 1 - packed bed reactor containing 2 g of Novozyme 435, flow rate: 1 ml.min<sup>-1</sup>, temperature: 60 °C. Conversion 2 - After complete de-hydration of the output of reactor 1 (using a molecular sieve or a dehydration column) and re-injection (1 ml.min<sup>-1</sup>) of the reaction mixture into a second packed bed reactor of 1 g of Novozyme 435 (at 60°C).**

<b>Ester</b>	<b>Conversion 1</b>	<b>Conversion 2</b>
<i>Isobutyl</i> - Oleate	85,4%	97,80%
<i>Isoamyl</i> - Oleate	86,1%	97,90%
<i>Isobutyl</i> - Linoleate	85.9%	98 ,0%
<i>Isobutyl</i> - Decanoate	83%	~ 96%
<i>Isoamyl</i> - Decanoate	83%	~ 96%
<i>Isobutyl</i> - Dodecanoate	83%	~ 96%
<i>Isoamyl</i> - Dodecanoate	83%	~96%
<i>Isobutyl</i> - Myristate	83%	~96%
<i>Isoamyl</i> - Myristate	83%	~96%
<i>Isobutyl</i> - esters from microbial oil	85%	~97%
<i>Isoamyl</i> - esters from microbial oil	85%	~97%

The freezing point of mixture of synthesized esters was compared with a promising alternative fuel for aircraft, FT-SPK (Fischer-Tropsch Synthetic Paraffinic Kerosene), also called GTL (gas to liquid). The freezing point of this fuel is -56.6°C. *Iso*-butyl and -amyl-Decanoate / GTL blends (10/90 V/V) present freezing points lower than the one of GTL (-62°C and -61°C respectively). At 20 and 30% of added esters, only *Iso*-amyl- Decanoate enabled the freezing point specification for jet fuel to be attained. Even at 10%, esters with

carbon numbers higher than 10 present freezing point higher than the one necessary to be in the specification.

## **V.6 Conclusion**

The objective of this work was to synthesize esters from an oil produced by the oleaginous yeast *Y. lipolytica* and ramified alcohols in order to lower the freezing point and the viscosity for application as a substitute for kerosene. A remarkable productivity of 100 tons of esters produced per year and per kg of enzymes was obtained in a continuous plug flow reactor.

We demonstrated that the proposed process is versatile, as it did not depend on the fatty acid used in the range from C10 to C18:2.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the French CALIN program and the European Alhabird program. This work was financially supported by Aerospace Valley. The authors thank Laurie Starck and Nicolas Jeuland from IFPEN for the determination of freezing point properties. Finally, the authors are very grateful to Mrs. Daphnée Goodfellow for correcting the English style.

## V.7 References

- 1 **IEA** (2013) - *Energy statistics of non-OECD Countries 2012 Edition*; available at: <http://www.iea.org/media/training/presentations/statisticsmarch/StatisticsofNonOECDCountries.pdf>
- 2 **Marsh, G.** *Biofuels: aviation alternative?* Renewable Energy Focus. (2008) 9: 48.
- 3 **Blakey, S., Rye, L., & Wilson, C. W.** *Aviation gas turbine alternative fuels: A review.* Proceedings of the combustion institute. (2011). 33(2), 2863-2885.
- 4 **Srinivasan, S.** The food v. fuel debate: A nuanced view of incentive structures. Renewable Energy. (2009). 34: 950-954.
- 5 **Huang, C., Chen, X. F., Xiong, L., Chen, X. D., Ma, L. L., & Chen, Y.** Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. Biotechnology advances. (2013). 31(2), 129-139.
- 6 **Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marc I. & Aggelis, G.** *Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1, 3-propanediol, citric acid and single cell oil.* Biomass and Bioenergy. (2008). 32(1), 60-71.
- 7 **Beopoulos, A., J. Cescut, R. Haddouche, J.-L. Uribelarrea, C. Molina-Jouve, and J.-M. Nicaud** *Yarrowia lipolytica as a model for bio-oil production.* Progress in Lipid Research. (2009). 48: 375.
- 8 **Yao, L., E. Hammond, and T. Wang** *Melting points and viscosities of fatty acid esters that are potential targets for engineered oilseed.* JAOCS. (2008). 85: 77-82.
- 9 **Adlercreutz, P.** *Immobilisation and application of lipases in organic media.* Chemical Society Reviews. (2013). 42(15), 6406-6436.
- 10 **Du, W., W. Li, T. Sun, X. Chen, and D. Liu** *Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts.* Appl Microbiol Biotechnol. (2008). 79: 331-7.
- 11 **Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C., & Irimie, F. D.** *Biodiesel production using enzymatic transesterification—current state and perspectives.* Renewable Energy, (2012). 39(1), 10-16.
- 12 **Séverac, E., Galy, O., Turon, F., Pantel, C. A., Condoret, J. S., Monsan, P., & Marty, A.** *Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact.* Enzyme and microbial technology, (2011). 48(1), 61-70.

- 13 **Séverac, E., Galy, O., Turon, F., Monsan, P., & Marty, A.** (2011). *Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil*. *Bioresource technology*, 102(8), 4954-4961.
- 14 **Slotema, W.F., G. Sandoval, D. Guieysse, A.J. Straathof, and A. Marty** *Economically pertinent continuous amide formation by direct lipase-catalyzed amidation with ammonia*. *Biotechnology and Bioengineering*. (2003) 82: 664.
- 15 **Dossat, V., D. Combes, and A. Marty** *Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production*. *Enzyme and Microbial Technology*. (1999) 25: 194.
- 16 **Hama, S., Tamalampudi, S., Yoshida, A., Tamadani, N., Kuratani, N., Noda, H., Fukuda, H. & Kondo, A.** *Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel*. *Biochemical Engineering Journal*. (2011). 55(1), 66-71.
- 17 **Bell, G., P.J. Halling, L. May, B.D. Moore, D.A. Robb, R. Ulijn, and R.H. Valivety,** *Methods for Measurement and Control of Water in Nonaqueous Biocatalysis*, in *Enzymes in Nonaqueous Solvents*. (2001). p. 105.
- 18 **Colombié, S., R.J. Tweddell, J.S. Condoret, and A. Marty** *Water activity control: A way to improve the efficiency of continuous lipase esterification*. *Biotechnology and Bioengineering*. (1998) 60: 362-368.
- 19 **Klamt, A. and F. Eckert** (2000) *COSMO-RS: a novel and efficient method for the a priori prediction of thermophysical data of liquids*. *Fluid Phase Equilibria*. 172: 43-72.
- 20 **Buggert, M., L. Mokrushina, I. Smirnova, R. Schomäcker, and W. Arlt** *Prediction of equilibrium partitioning of nonpolar organic solutes in water-surfactant systems by UNIFAC and COSMO-RS models*. *Chemical Engineering & Technology*. (2006) 29: 567-573.
- 21 **Graber, M., M.-P. Bousquet-Dubouch, S. Lamare, and M.-D. Legoy** *Alcoholysis catalyzed by Candida antarctica lipase B in a gas/solid system: effects of water on kinetic parameters*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*. (2003) 1648: 24.
- 22 **Valivety, R.H., P.J. Halling, A.D. Peilow, and A.R. Macrae** *Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media*. *European Journal of Biochemistry*. (1994) 222: 461.
- 23 **Bousquet-Dubouch, M.-P., M. Graber, N. Sousa, S. Lamare, and M.-D. Legoy** *Alcoholysis catalyzed by Candida antarctica lipase B in a gas/solid system obeys a*

- Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. (2001) 1550: 90.
- 24 **Sandoval, G. C., Marty, A., & Condoret, J. S.** *Thermodynamic activity-based enzyme kinetics: Efficient tool for nonaqueous enzymology.* AIChE journal (2001), 47(3), 718-726.
- 25 **Dossat, V., D. Combes, and A. Marty** *Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent-free process.* Journal of Biotechnology. (2002) 97: 117.

## VI : CONCLUSION GÉNÉRALE

L'amointrissement des ressources pétrolières, les effets de l'émission intensive de gaz à effet de serre, les catastrophes climatiques et écologiques en tout genre encouragent à modifier nos comportements de production et de consommation. De plus en plus, le concept de développement durable s'installe dans les esprits et devient incontournable. Cette démarche est de plus en plus soutenue par l'opinion publique et par les législations et réglementations nationales, européennes et internationales. Plusieurs concepts (écologie industrielle, production propre, chimie verte) ont vu le jour pour atteindre ce but commun de développement durable, placé au centre de tous les intérêts, écologiques, économiques et sociaux.

Les huiles végétales constituent une matière première renouvelable hautement disponible dans le monde. Les caractéristiques physico-chimiques de ces huiles ne sont pas idéales pour les domaines d'application pouvant être envisagées (biodiesels, biolubrifiants, biosolvants et autres...). Leur transformation par réaction de transestérification alcoolique, utilisant des voies de synthèse répondant au contexte de développement durable est donc un enjeu de taille. Les propriétés physico-chimiques des esters dépendant à la fois de la partie acide gras et de la partie alcool d'estérification, la variété immense des huiles disponibles, leur richesse de composition en acides gras et les différents alcools disponibles (linéaires, ramifiés etc...) permettent d'adapter au mieux les propriétés des esters d'acides gras formés aux applications ciblées.

L'huile de tournesol hautement oléique (teneur en acide oléique de 75% à 90%) a été choisie comme référence dans cette étude. L'acide oléique, avec une double liaison unique, présente des propriétés de stabilité oxydative, de viscosité et de comportements à basse température fortement intéressantes dans de nombreuses applications industrielles. De même, le butanol a été choisi comme alcool de référence pour la synthèse d'ester en raison de ces capacités à diminuer efficacement les viscosités et les points de fusion des esters synthétisés. L'ester

butylique d'acide oléique présente entre autre des propriétés biolubrifiantes grandement valorisables.

La mise en oeuvre des catalyseurs biologiques, et plus particulièrement des lipases immobilisées dans les réactions de transestérification des huiles, permet de pallier aux conditions réactionnelles drastiques, utilisées dans l'industrie chimique classique. Cela permet, de plus, de répondre tout ou partie aux exigences de la chimie verte. Les limitations principales de leur utilisation sont un prix pouvant être prohibitif, obligeant à les mettre en oeuvre dans des réacteurs continus, hautement productifs et durables dans le temps. Cela représente le meilleur moyen de réduire l'incidence du coût des biocatalyseurs sur le produit fini. Le réacteur à lit fixe est la géométrie de réacteur permettant une utilisation optimale du biocatalyseur. Il permet des volumes de réacteur faibles, des productivités importantes tout en limitant l'usure des supports enzymatiques liée à l'agitation.

Dans le but d'assurer la pérennité de tels réacteurs dans le temps, le point crucial est de contrôler les phénomènes de partage des composés polaires (glycérol produit, phospholipides présents dans les huiles vierges etc...) entre milieu réactionnel et support enzymatique. Principalement, le glycérol produit au cours de la réaction de transestérification peut facilement s'adsorber sur les supports enzymatiques. Une couche hydrophile de glycérol se forme autour de l'enzyme, ce qui limite les transferts des substrats hydrophobes vers le site actif de l'enzyme ou des produits synthétisés vers le milieu réactionnel. En condition de réaction continue, cela se traduit par une diminution significative d'activité, pouvant aller jusqu'à une perte totale d'activité. Le phénomène similaire a été observé avec les phospholipides des huiles vierges dans des systèmes ne contenant pas de solvant. Au cours de la présente étude, plusieurs stratégies permettant de maintenir la stabilité des réacteurs à lit fixe ont été envisagées.

La première stratégie consiste à optimiser la conversion de l'huile de tournesol hautement oléique (triacylglycérols) et intermédiaires de réaction (diacylglycérols, monoacylglycérols) dans le but de produire le maximum d'esters butyliques tout en contrôlant l'évacuation du glycérol hors du réacteur afin d'en assurer la stabilité. Pour se faire, l'utilisation de solvants polaires tels que le *tert*-butanol permet de solubiliser à la fois les composés apolaires (triglycérides substrats, esters produits et intermédiaires) ainsi que polaires (glycérol produit ou phospholipides des huiles vierges etc...). Il est ainsi possible d'envisager la transformation directe des huiles vierges en s'affranchissant d'étapes préalables de raffinage coûteuses, transformation qui est problématique sans usage d'un tel solvant.

Les quatre lipases commerciales immobilisées les plus communément utilisées dans l'industrie ont été testées sur la réaction discontinue de butanolyse de l'huile de tournesol hautement oléique en présence ou non de solvants en réacteurs fermés. Parmi ces quatre, seul le Novozyme 435 présente une absence de spécificité envers les positions *sn1* et *sn3* des triacylglycérols, nécessaire pour optimiser les rendements en minimisant les productions de DAGs et MAGs intermédiaires réactionnels. Cette lipase a donc été utilisée pour le développement d'un réacteur à lit fixe à l'échelle du laboratoire contenant 10g de lipase immobilisée. Si le milieu sans solvant présente des avantages certains notamment dans une optique de haute productivité, l'utilisation d'un solvant tel que le *tert*-butanol paraît nécessaire pour le développement d'un procédé continu. En effet, nous montrons que l'utilisation d'huiles vierges entraîne un phénomène d'inhibition du biocatalyseur dépendant de la polarité du milieu. Le *tert*-butanol permet d'augmenter la solubilité des phospholipides de l'huile vierge et donc réduit leur capacité à s'adsorber sur le support enzymatique.

L'effet de la polarité du milieu sur le procédé continu a été étudié en balayant une gamme de concentration en huile allant de 200mM à 703 mM, correspondant à un milieu sans solvant. La polarité du milieu réactionnel influence tous les aspects de la catalyse enzymatique. C'est

elle qui (i) la vitesse réactionnelle (ii) contrôle les phénomènes de partage des composés polaires (glycérol, phospholipides et autres...) entre le milieu de réaction et le support enzymatique et donc la stabilité du réacteur, (iii) contrôle la composition du mélange de produits en sortie du réacteur à l'équilibre thermodynamique et (iv) la productivité du réacteur.

Ainsi, le développement du réacteur de transestérification de l'huile vierge de tournesol hautement oléique s'avère être un compromis entre stabilité, pureté du mélange d'esters produit et des capacité de production du réacteur. Les meilleures conditions ont été obtenues pour un mélange contenant 500 mM d'huile. Cela permet de définir des conditions de polarité qui éliminent les phénomènes néfastes dus à la présence de phospholipides ou de glycérol, d'optimiser la stabilité du réacteur durant plus de 50 jours sans aucune perte d'activité, de minimiser la présence de MAG résiduels dans une quantité acceptable et pouvant être valorisée (augmentation de lubricance, propriétés bio-surfactantes) et enfin de maximiser la productivité à une valeur de 13,8 tonnes de mélange d'esters par an et par kg de novozyme 435. A la vue de cette grande stabilité, il peut être envisagé un procédé de catalyse extrêmement pérenne, présentant une cohérence économique certaine.

L'effet de la transestérification enzymatique en réacteur continu sur les composés mineurs des huiles (vierges et raffinées) a été évalué. Différentes huiles vierges aux caractéristiques différentes ont été utilisées : l'huile vierge de colza pour sa haute teneur en phospholipides, l'huile de tournesol pour sa composition riche en tocophérols et l'huile d'olive qui contient énormément de composés phénoliques. Le réacteur enzymatique à lit fixe développé dans le chapitre II a permis d'obtenir les esters butyliques correspondant aux huiles utilisées. Outre le fait que l'utilisation d'huiles différentes montre l'adaptabilité du réacteur à tout type d'huiles, les différents composés essentiels ont pu être dosés selon les normes en vigueur avant et après

réaction. Tous les composés mineurs, présents dans les huiles vierges, sont préservés lors du processus catalytique. Seul un effet de dilution lié à la réaction elle-même a été observé. La transformation d'huile vierge permet donc d'obtenir des esters dont la teneur en antioxydants naturels est supérieure. Par ailleurs, ces composés, qui sont susceptibles d'être responsable de perte de stabilité du réacteur par phénomène d'adsorption, sont évacués continuellement du réacteur.

La mesure de la stabilité oxydative par la technique du rancimat montre que le procédé de transestérification continue grâce à ses conditions douces de mise en œuvre, un temps de séjour dans le réacteur relativement faible et aucune exposition à l'air ambiant, n'induit pas ou peu de stress oxydatif. Les esters synthétisés par son biais conservent les propriétés de résistance à l'oxydation de l'huile dont ils sont issus. Les esters obtenus à partir d'huile vierge contenant des taux importants de composés mineurs présentent des résistances oxydatives supérieures aux esters synthétisés à partir d'huile raffinée. Le réacteur à lit fixe développé ici permet donc l'obtention d'esters hautement résistants répondant largement aux spécifications éditées dans les normes. Les mélanges d'esters issus des huiles vierges de tournesol hautement oléique, de colza et d'olive ont présentés des temps d'induction respectifs, avec la technique du rancimat ( $110^{\circ}\text{C}$ ,  $10\text{L d'O}_2\cdot\text{h}^{-1}$ ), de 23,3 h ; 10,4 h et 17,5 h, soit 17,3h ; 4,4h et 11,5h de plus que les standards imposés par la norme relative au biodiesel (EN 14214 par exemple).

Un catalogue d'une douzaine alcools allant des alcools linéaires primaires aux alcools linéaires secondaires (2-propanol, 2-butanol) via les alcools primaires ramifiés, des amines (butylamine etc..) ou encore des alcanolamines (éthanolamine, butanolamine) ont été testés avec succès sur le réacteur mis au point dans cette étude. Chaque produit obtenu a ainsi des

propriétés de viscosité, comportements à basse température voire de pouvoirs surfactants (selon la molécule) etc... qui leur sont propres. Ceci ouvre la porte à de très nombreuses applications et voire même à la possibilité de productions sur mesure selon les applications ciblées.

La valeur ajoutée due à l'utilisation de Novozyme 435 dans ce réacteur à lit fixe sur le coût du produit final a été déterminée à 0,08 euros par kg de produits, en considérant un temps de remplacement de l'enzyme de 1 an. Si cette valeur paraît raisonnable, elle peut néanmoins être limitante selon l'application vers laquelle s'adresse le mélange d'esters. Par exemple, la tonne de biodiesel se négocie autour de 950 à 1150 euros en considérant un cours des huiles entre à 800 à 1000 euros par tonne selon la source. Un surcoût de près de 1%, uniquement dû au biocatalyseur, comme développé ici, peut représenter un investissement délicat. Des solutions existent pour en réduire davantage l'incidence et augmenter la pertinence économique. En premier lieu, le développement de nouveaux biocatalyseurs dont le coût opérationnel est maîtrisé et engendrant une stabilité sans faille, est une alternative envisageable.

Ainsi, l'immobilisation de la lipase B de *Candida antarctica* (CalB) a été optimisée sur un support extrêmement hydrophobe, l'Accurel MP (taille des particules < 1000µm). Ce support ne permet en aucun cas, de part sa nature, la fixation des composés polaires (glycérol). La stabilité du biocatalyseur ainsi produit est donc optimale. Le processus d'immobilisation nécessite un prétraitement du support avec un solvant afin de faciliter la pénétration de la phase aqueuse hydrophile contenant l'enzyme dans les pores extrêmement hydrophobes du support. Les méthodes classiques présentées dans la littérature utilisent comme solvant l'éthanol. CalB, étant réputée pour sa grande résistance aux solvants, a été immobilisée en utilisant un solvant plus efficace : l'acétone. Ce solvant permet une pénétration accrue du

milieu d'immobilisation dans le support, de diminuer plus efficacement l'activité thermodynamique de la lipase dans le milieu liquide et, par voie de fait, d'optimiser son adsorption sur le support.

L'analyse du processus d'immobilisation montre que le coût de revient de la lipase immobilisée est grandement dépendante du ratio entre quantité de lipase utilisée et quantité de support mise en contact. Ainsi, plus le ratio est élevée (ce qui correspond à l'obtention du biocatalyseur le plus actif), plus le coût est important et inversement. Les différents biocatalyseurs générés, présentant des taux d'activité différents, ont été utilisés pour développer un réacteur à lit fixe permettant une production annuelle identique. Par soucis de simplification, une réaction de substitution permettant des analyses simplifiées et des temps réactionnels plus court a été utilisée : l'estérification de l'acide oléique avec du butanol. Les optima réactionnels ont été considérés comme fort probablement identiques.

L'analyse économique du procédé continu permet de maximiser la valeur nette actualisée en minimisant les différents centres de dépenses et d'investissements liés à son exploitation. Les coûts d'investissement du réacteur ont été estimés en utilisant des techniques d'évaluation empruntées à l'industrie chimique pour une production fixée à 10000 tonnes d'esters par an. Nous montrons que les investissements nécessaires pour la construction d'un réacteur sont nettement inférieurs aux dépenses liées à la lipase immobilisée nécessaires pour assurer la catalyse tout au long du temps de vie du procédé (premier remplissage et renouvellements). Selon les conditions d'immobilisation (ratio entre quantités de lipase et de support en contact), le coût d'enzyme nécessaire pour assurer la productivité ciblée peut être de 2 à 10 fois supérieurs aux investissements générés par le réacteur. En conséquence, le développement du réacteur le plus actif possible i.e. le moins volumineux n'est pas une nécessité. Au contraire, il est préférable de développer le biocatalyseur permettant de minimiser les coûts au maximum, même si le volume du réacteur est important. Un ratio entre

quantités d'accurel (g) et volum de lipase (L) mis en contact de 40 g/L a ainsi été obtenu comme optimal.

Le biocatalyseur présentant les meilleures performances économiques a été utilisé en réaction continue de transestérification d'huile vierge de tournesol hautement oléique dans des conditions identiques à celles utilisées avec le Novozyme 435. Aucune différence dans le profil de produits n'a été détectée. Ainsi, l'immobilisation de la lipase sur Accurel MP n'induit pas de modification de comportement réactionnel, mais permet d'améliorer l'impact économique du procédé. Une réduction de l'ordre de 50% par rapport à Novozyme 435 a été calculée.

Une seconde stratégie a été développée pour éviter l'effet indésirable du glycérol et consiste à ne pas en produire : la réaction de transestérification est limitée à la production de monoacylglycérols. Les enzymes hautement régio-spécifiques permettent de catalyser la réaction de transestérification des résidus d'acides gras présents en position *sn1* et *sn3*, mais ne permettent pas de réaction au niveau du résidu positionné en *sn2*. La réaction produit ainsi deux molécules d'esters et une molécule de *sn2*-monoacylglycérol à partir d'une molécule de triacylglycérol, sans production de glycérol libre.

Les *sn2*-monoglycérides représentent une forme de valorisation importante du glycérol co-produit de ces réactions de production d'esters. En effet, produit avec pureté, il est un précurseur de synthèse de triglycérides structurés, notamment des MLM (medium-long-medium). Ces triacylglycérols contiennent en position externe des acides gras de chaîne carbonée de longueur moyenne (généralement C8 et/ou C10), et un acide gras essentiel à longue chaîne en position *sn2*. Une fois ingérée, la lipase pancréatique hydrolyse plus facilement les positions externes du triacylglycérol MLM du fait de la présence d'acide gras

de taille moyenne. L'absorption intestinale du *sn2*-monoacylglycérol ainsi produit est facilitée.

Les monoacylglycérols présentent des solubilités dans les huiles, esters ou mélanges huiles esters bien plus élevés que le glycérol. Ils ne sont donc pas susceptibles de s'adsorber sur les supports et d'empêcher le bon fonctionnement de la biocatalyse. Aussi, dans le cas où le processus de migration d'acyles, entraînant l'isomérisation des formes *sn2* vers les formes *sn1* ou *sn3*, soit complètement maîtrisé voire interrompu, il est possible d'effectuer en continu la transformation des huiles végétales sans subir les effets néfastes de la production de glycérol. Cette stratégie permet de plus de s'affranchir de l'utilisation de solvants.

Les lipases immobilisées régio-spécifiques, disponibles dans le commerce (Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, Lipase PS Amano IM) et dans le laboratoire (*Yarrowia lipolytica* Lip2 immobilisée sur support d'Accurel) ont été testées sur cette réaction de transestérification de l'huile de tournesol hautement oléique avec le butanol. Les essais en réacteur fermé montrent que la spécificité de la lipase Lip2 de *Y. lipolytica* est très supérieure à celle des autres lipases testées et est donc très prometteuse pour cette réaction partielle. Elle permet l'obtention de rendements importants en *sn2*-monoacylglycérols et une pureté du *sn2*-monooléylglycérol produit (analyse par RMN) de 96%.

Cependant, la lipase Lip2 de *Y. lipolytica* n'a pu être mise en oeuvre en réacteur continu à lit fixe dans un système sans solvant, la stabilité opératoire n'ayant pas été satisfaisante. Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène. Les MAG produits en cours de réactions sont des molécules amphiphiles qui seraient capables de s'insinuer entre l'enzyme adsorbé et son support hydrophobe et donc d'entraîner la désorption de l'enzyme de son support. Le résultat en condition de catalyse continue est une perte des capacités catalytique par fuite de l'enzyme dans le milieu réactionnel. La seconde hypothèse est que les MAGs

seraient un puissant inhibiteur de la lipase lip2 de *Y. lipolytica*. En effet, la stabilité du réacteur. est assurée lorsqu'un solvant polaire (*tert*-butanol) est utilisé. Cela tendrait à dire que la disponibilité des MAG produits est diminuée grâce au solvant et de fait le phénomène d'inhibition est réduit.

Pour ces raisons, cette troisième stratégie de production partielle d'esters reste en essai dans le laboratoire, notamment au travers du développement de techniques d'immobilisation de la lipase via liaisons covalentes ou entrappement

La troisième stratégie de production d'esters a été développée au cours d'un projet connexe de production d'esters ramifiés par réaction d'estérification catalysée par le Novozyme 435 pour une application bio-kerosene. Cette approche a été réalisée en utilisant des huiles microbiennes comme matières premières. Cependant, celles-ci sont difficilement disponibles en quantité suffisante. Le développement du procédé a donc été réalisé en utilisant une source végétale permettant de modéliser le substrat envisagé. Cette approche est donc totalement transposable et intégré dans ces travaux de thèse.

La stratégie a été envisagée en deux étapes : une première phase d'hydrolyse (non exposée dans ce manuscrit) et une seconde d'estérification directe des acides gras libres. Le but de cette approche est double. Cela permet en premier lieu de séparer le glycérol des triacylglycérols au cours de l'étape d'hydrolyse pour ne gérer que de l'eau produite au cours de la seconde étape d'estérification. Ensuite, cela permet de profiter de la différence de vitesse réactionnelle entre réactions de transestérification et d'estérification pour augmenter la productivité annuelle par kg de biocatalyseur.

La modélisation thermodynamique des systèmes réactionnels envisagés (milieux contenant du solvant ou milieu sans solvant) grâce au logiciel *Cosmotherm* a permis de déterminer la faisabilité de mise en œuvre de chacun de ces milieux dans une optique de haute productivité

(concentrations élevées). La modélisation des solubilités de l'eau dans les milieux complexes (milieux réactionnels à 100% de conversion) permet de déterminer que, à l'exception du diisopropyl ether à une concentration initiale en acides gras de 1.5M, les solvants retenus et le milieu sans solvant sont capables de solubiliser l'intégralité de l'eau produite en cours de réaction sans problème de démixtion de phases. Les systèmes réactionnels envisagés permettent l'évacuation de l'eau produite en cours de réaction et donc permettent d'assurer la pérennité du réacteur.

Le logiciel *Cosmo<sup>therm</sup>* permet par ailleurs la détermination des activités thermodynamiques de chacun des composants intervenant dans la réaction, en tout point du réacteur soit en fonction de l'avancement de la réaction ou en fonction d'une conversion donnée. Le profil de l'activité de l'eau entre 0% et 100% de conversion a été établi pour chaque système réactionnel pour différentes concentrations initiales en acide gras à ratio molaire entre substrat fixé. La variation de l' $a_w$  est fonction du système et de la concentration initiale en acide gras : plus la celle-ci est importante plus l' $a_w$  finale est élevée. Etant donné que l'augmentation de l' $a_w$  influe négativement sur l'activité de Novozyme 435. La gamme de concentrations initiale entraînant une  $a_w$  finale synonyme de compromis entre productivité et dépense de biocatalyseur a été déterminé. Une  $a_w$  finale comprise entre 0,3 et 0,4 a été considérée comme le meilleur compromis.

L'activité de chacun des composés intervenant dans la réaction influence l'équilibre thermodynamique. Afin de modéliser cet effet, le quotient K (entre produit des activités de l'ester et de l'eau produite et produit des activités de l'acide gras et de l'alcool à l'équilibre) a été modélisé pour chacun des systèmes réactionnels à différente conversion finale. Le système sans solvant paraît être le meilleur milieu pour réduire K. Ainsi, le milieu sans solvant offre les plus grandes garanties de productivité et de conversion. Cela a été vérifié

expérimentalement en réaction batch. Il a donc été utilisé pour développer un procédé continu de production d'esters.

Les conditions réactionnelles et opératoires ont été optimisées. Le réacteur développé contenait 2g de Novozyme 435. Les meilleures performances alliant productivité et conversion ont été obtenues avec un rapport molaire entre substrats de 3 (soit une concentration initiale en acide gras de 1,7 M) et un débit de  $60 \text{ ml.h}^{-1}$ . Un taux de conversion de 85,4% est obtenu en sortie de réacteur. Ainsi une productivité annuelle en esters purs de 129 tonnes par kg de Novozyme 435 a été atteinte dans ces conditions. Cela représente une augmentation de productivité d'un rapport 9,3 par rapport à celle obtenue en conditions de transestérification continue. Une production continue d'esters a été possible pendant 54 jours consécutifs sans présenter de perte d'activité

La faisabilité d'un système à double réacteur séparé par un système permettant de retirer l'eau générée par la réaction a été testée dans le but d'augmenter le taux de conversion obtenu avec un réacteur unique. La conversion a ainsi été augmentée de 85% à 97%. Cette augmentation de conversion s'accompagne d'une légère diminution de la productivité calculée à 100 tonnes d'esters par an et par kg de Novozyme 435.

Cette productivité reste toute fois remarquable et le taux de conversion obtenu implique un amoindrissement du processus de purification des esters en aval. Cela permet de réduire considérablement les coûts. Sans tenir compte de ces étapes de purification, en considérant une production de 100000 tonnes par an, les investissements liés à l'utilisation de Novozyme 435 dans ce procédé d'estérification continue ont été estimés à seulement 1,5% du chiffre d'affaire généré par son exploitation. En comparaison, cela représente un coût ajouté au

produit final de seulement 1,1 centime d'euro par kg soit 7,3 fois moins que le coût ajouté par le procédé de transesterification continue développé dans le chapitre II. En considérant le nouveau biocatalyseur développée au cours du chapitre IV, le procédé présente une pertinence économique évidente qui le rend extrêmement compétitif avec les procédés chimiques classiques.

Financée par un industriel, cette thèse a été fortement imprégnée par une approche pragmatique du développement de procédés enzymatiques. La critique souvent faite aux approches enzymatiques est le coût élevé du biocatalyseur. Nous espérons, à l'issue de ce travail sur le développement de procédés continus, avoir apporté un élément de réponse positif à cette problématique. Par une approche d'ingénierie des solvants, la mise en place de réacteurs continus efficaces et l'optimisation de l'étape d'immobilisation des catalyseurs, il a été possible d'atteindre des productivités élevées de 11 à 100 tonnes de produits par an et par kg d'enzyme, ce qui permet d'amortir le coût de l'enzyme. Ce qui pourrait être désormais envisagée est l'évolution moléculaire des enzymes impliqués pour améliorer leur activité, stabilité et spécificité.

