



HAL
open science

Coupure de liaisons glycosidiques de la biomasse saccharifère couplée à la formation de liaisons esters amphiphiles

Sidrine Kerthy Koumba Ibinga

► **To cite this version:**

Sidrine Kerthy Koumba Ibinga. Coupure de liaisons glycosidiques de la biomasse saccharifère couplée à la formation de liaisons esters amphiphiles. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT; Université des Sciences et Techniques de Masuku (Gabon), 2020. Français. NNT : 2020INPT0062 . tel-04193795

HAL Id: tel-04193795

<https://theses.hal.science/tel-04193795v1>

Submitted on 1 Sep 2023

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 Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

Mme SIDRINE KOUMBA IBINGA

le vendredi 17 juillet 2020

Titre :

Coupure de liaisons glycosidiques de la biomasse saccharifère couplée à la formation de liaisons esters amphiphiles

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA)

Directeur(s) de Thèse :

M. GERARD VILAREM

M. RAPHAEL BIKANGA

Rapporteurs :

M. JEAN-MAURILLE OUAMBA, UNIVERSITE MARIEN NGOUABI BRAZZAVILLE

M. THIERRY BENVENU, ECOLE NATIONALE SUP DE CHIMIE DE RENNES

Membre(s) du jury :

M. THIERRY DURAND, CNRS, Président

M. GERARD VILAREM, TOULOUSE INP, Membre

M. JACQUES LEBIBI, UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECH MASUKU, Membre

M. JEAN-BERNARD BONGUI, UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECH MASUKU, Membre

Mme SOPHIE FRANCESCHI, UNIVERSITE PAUL SABATIER, Membre

M. RAPHAEL BIKANGA, UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECH MASUKU, Membre

M. ZEPHIRIN MOULOUNGUI, INRA TOULOUSE, Invité



THESE

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat de
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE MASUKU
Ecole Doctorale en Sciences Fondamentales et Appliquées (ED-SFA)

Spécialité : **Chimie Organique**
Option : **Synthèse Organique**

Cotutelle internationale : **Université de Toulouse**

Titre :

**Coupure de liaisons glycosidiques de la biomasse
saccharifère couplée à la formation de liaisons esters
amphiphiles.**

Présentée et soutenue publiquement par
Sidrine Kerthy KOUMBA IBINGA
Le 17 juillet 2020

COMPOSITION DU JURY

Thierry DURAND	Directeur de Recherche CNRS, Université de Montpellier	Président
Thierry BENVENU	Professeur CNRS, Université de Rennes	Rapporteur
Jean-Maurille OUAMBA	Professeur Titulaire CAMES, Université Marien N'GOUABI	Rapporteur
Sophie FRANCESCHI	Maître de Conférences, Université de Toulouse	Examineur
Jean-Bernard BONGUI	Maître de Conférences, Université de Masuku	Examineur
Jacques LEBIBI	Professeur Titulaire CAMES, Université de Masuku	Examineur
Raphaël BIKANGA	Professeur Titulaire CAMES, Université de Masuku	Directeur de thèse
Gérard VILAREM	Ingénieur de Recherche, Université de Toulouse	Directeur de thèse
Zéphirin MOULOUNGUI	Dr ès Sciences-Consultant-Expert Scientifique & Techniques	Invité

Dédicaces

*A mon **Paraclet**,*

Pour sa présence infallible

A mon père, parti trop tôt

*Feu **Marcel IBINGA KOMBILA**,*

Pour son amour, ses précieux conseils et l'honneur d'être sa fille.

A ma tendre mère,

***Marie-Thérèse MAGANGA**,*

Pour son amour, son soutien moral et ses sacrifices pour notre réussite.

A mes frères et sœurs,

***Brice, Sternny, Mélissa, Graziéla, Alex**,*

Pour leur affection, leur soutien et leurs encouragements.

A mes enfants

Jamila, Charmine, Danielle et ceux qui sont en route.

A ma famille de cœur

Gré DOUNIAMA-LÖNN, Aurore OKOUMBA, Sophie DJONDO

Patrick ANGUILET, Arsène BIKORO, John KOMBE

Pour le soutien en toutes situations que vous avez eu envers moi.

Diboty...

Il y a un temps pour tout, un temps pour toute chose sous les cieux

Un temps pour naître, et un temps pour mourir

Un temps pour abattre, et un temps pour bâtir

Un temps pour pleurer, et un temps pour rire

Un temps pour s'embrasser, et un temps pour s'éloigner des embrassements

Un temps pour chercher, et un temps pour perdre

Un temps pour parler, et un temps pour se taire

Un temps pour aimer, et un temps pour haïr

Un temps pour la guerre, et un temps pour la paix

Il fait toute chose bonne en son temps.

Remerciements

Ce mémoire est le résultat d'une convention signée entre l'Institut National Polytechnique de Toulouse (France) et l'Université des Sciences et Technique de Masuku (Gabon) pour la durée de 2016-2019.

Je tiens à adresser ma profonde gratitude et à remercier tous ceux qui ont participé à l'élaboration de ce travail.

Je tiens premièrement à remercier chaleureusement mes directeurs de thèse Mr MOULOUGUI, Mr BIKANGA, et Mr VILAREM sans lesquels ce projet de doctorat n'aurait pas vu le jour.

Mr Zéphirin MOULOUGUI, je tiens à vous remercier de m'avoir accueillie et intégrée au sein du Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA) pour mon stage de master 2 et pour ce projet de thèse. Ces années de formation à vos côtés m'ont permis de donner un sens à la chimie organique et particulièrement à la chimie des Agroressources et à la Lipochimie ou Oléochimie. Je comprends et redécouvre le trésor caché des plantes. Je vous remercie pour l'approche pluridisciplinaire et la curiosité que vous avez éveillée en moi. Je repars avec la satisfaction d'avoir essayé plusieurs réactions qui constitueront mes projets pour l'avenir. Veuillez trouver dans ces quelques lignes l'expression de ma profonde reconnaissance pour votre soutien en toutes circonstances et pour les encouragements sur le développement de la recherche en Afrique pour laquelle vous avez participé grandement.

Mr Raphaël BIKANGA, c'est avec vous que tout a commencé à l'USTM. Vous avez su me transmettre l'amour pour la chimie organique dès mes premières années universitaires. Merci de m'avoir prise sous votre aile et accompagnée durant toutes ces années. Je vous remercie pour l'investissement intellectuel, le soutien moral et financier. Merci pour le temps que vous m'avez accordé, les conseils prodigués et l'affection que vous avez eue à mon égard. Vous avez su m'encourager dans l'effort et la persévérance. Merci d'avoir participé à l'éclosion de la première doctoresse Vungu. Votre investissement sera récompensé. Enfin, merci d'avoir placé votre confiance en moi et de m'avoir proposé en stage à Mr MOULOUGUI.

Mr Gérard VILAREM, je tiens à vous remercier d'avoir accepté de m'accompagner dans la dernière ligne droite de ma thèse suite au départ à la retraite de Mr MOULOUGUI. Je vous remercie pour votre disponibilité, compréhension et pour l'efficacité avec laquelle vous avez

traité certaines de mes interrogations et demandes. Trouver dans ces quelques lignes l'expression de ma profonde gratitude pour le temps accordé et les dispositions prises afin de rendre cette soutenance possible.

Je tiens ici à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail malgré la situation sanitaire instable actuelle provoquée par le Covid-19 depuis mars 2020.

Je remercie Mr Thierry DURAND, Directeur de Recherche CNRS, responsable du département Lipides à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de l'Université de Montpellier, d'avoir accepté de faire le déplacement sur Toulouse afin de présider ce jury de thèse.

Je suis honorée que Mr Thierry BENVENU, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR) et Mr Jean-Maurille OUAMBA, Professeur Titulaire CAMES, Vice-Recteur chargé des Affaires Académiques et responsable de l'Unité de Chimie du Végétal et de la Vie (UC2V) de l'Université Marien N'GOUABI de Brazzaville (Congo), aient accepté d'être rapporteurs de ce jury de thèse. Merci d'avoir pris le temps de juger ce travail.

Je remercie Mr Jacques LEBIBI, Professeur Titulaire CAMES et Directeur de l'Ecole Doctorale Régionale d'Afrique Centrale en Infectiologie Tropicale de Franceville (Gabon), d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Je remercie Mme Sophie FRANCESCHI, Maître de Conférences à l'Université Paul Sabatier et Mr Jean-Bernard BONGUI, Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Techniques de Masuku, d'avoir accepté de prendre part à ce jury de thèse.

Je tiens à remercier le gouvernement gabonais au travers de l'Agence Nationale des Bourses du Gabon (ANBG) et Campus France pour la bourse mise à ma disposition afin d'effectuer ces travaux de recherche. Je remercie la direction du LCA et les membres de l'administration de l'Institut National Polytechniques de Toulouse pour le complément de bourse accordé pendant toute la durée de ma thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du LCA qui, par leur gentillesse et leur disponibilité, ont rendu le quotidien de ces trois années de thèse agréable et chaleureux. Merci pour l'assistance en toute situation.

Je remercie Mr Gérard VILLAREM, Directeur du LCA et Mr Carlos VACA GARCIA, Directeur –Adjoint du LCA pour l'accueil au sein du laboratoire.

Je remercie Jean-François FABRE pour sa disponibilité, sa sympathie, les explications et le temps pris dans la correction et la relecture de ce manuscrit. Merci pour l'expertise apportée concernant plusieurs domaines, notamment celui des mucilages. Merci pour le soutien tout au long de la durée de ces travaux.

Je remercie Muriel Cerny, pour toutes les analyses chromatographiques réalisées sur l'huile, les acides gras, les esters méthyliques et les monoglycérides. Merci pour le temps pris à la formation de cet outil analytique. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et ta douceur.

Je remercie Romain VALENTIN pour la disponibilité, les discussions et les critiques constructives visant l'amélioration de ces travaux. Merci pour l'implication et l'expertise apportées pour renforcer la qualité de ce travail. Merci également pour le soutien au cours de la rédaction.

Je remercie Eric Lacroux, pour sa disponibilité et pour toute l'aide technique et expérimentale apportée tant sur le traitement des matières premières. Merci pour le soutien et pour la bonne humeur au cours du pressage des graines de *I. gabonensis* qui n'a pas été si facile.

Je remercie Monsieur Othmane Merah pour les conseils prodigués tout au long de ses trois années, pour ses paroles de soutien et sa bonne humeur.

Gwendoline Gravé pour tout le travail abattu autour de la graine de chia et pour sa bonne humeur et son humour.

Je remercie Mireille Juan, Christina Labéjof, Karine Trémauville, Didier Danglan pour l'aide administrative et le soutien en tout genre. Je remercie Ingrid Pelletier et Emmanuelle Dao pour votre disponibilité et votre bonne humeur. Merci pour tous les tubes RMN passés. Je remercie Romain Armengo pour sa disponibilité et réactivité dans l'approvisionnement de matériels et de solvants. Merci pour le soutien et les compliments sur mes coiffures.

Je remercie tous les membres du laboratoire qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail. Ainsi que tous les thésards qui par leur sympathie et leur disponibilité ont facilité mon intégration au sein du laboratoire.

Je remercie tous les enseignants de l'Université des Sciences et Technique de Masuku, en particulier ceux du département de chimie pour leurs conseils et leurs encouragements. Je remercie l'administration pour le traitement de mes dossiers d'inscription.

Je remercie Mr Yannick Coppel et Mr Marc Vedrenne pour le temps pris dans l'exécution des analyses RMN réalisées sur les mucilages.

Je remercie Toussaint GNAORE et Nikiema DIAKARIDJA pour l'apport scientifique et le soutien moral apporté. Merci à Gildas NYAME pour les échanges qui m'ont permis de comprendre certains aspects de ce travail et de l'améliorer. Je remercie Hermine NSA MOTO et son mari qui m'ont accueilli dans leur maison et qui ont facilité mon intégration à Toulouse. Je remercie Jeanne KOUASSI pour son assistance dans cette période difficile de l'année 2019. Merci pour les échanges qui m'ont permis de devenir une meilleure personne.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mes pasteurs Mr Daniel JOO et Mr David RAMPAUD de l'Eglise Evangélique Toulouse Minimes pour votre assistance et accompagnement spirituel, moral et matériel ainsi que pour vos encouragements et paroles de bénédictions louant la réussite de ce projet. Un grand merci à toutes mes sœurs et tous mes frères de cette assemblée. Vous êtes la famille qu'Il m'a donnée à Toulouse, sans laquelle cette expérience n'aurait pas été complète. J'ai été forgée et formée à votre contact afin de grandir dans l'Agapé. Je vous prie de trouver à travers ces quelques lignes l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie tous mes ami(e)s à travers le monde pour leur soutien par leurs appels et messages.

Je remercie mes mamans Denise IBONDOU, Colette MOUVANGUI, Annie-Flore TSOUKA, Germaine DIGHONDI, Dédé ADAMAH, mes sœurs Salama, Flammena, Alida, Kelly, Jessica, Célia, Marlène, Sandra, Mahiné, Gladys, Sidonie, pour le soutien, les conseils et les encouragements. Je remercie mes frères et amis Tataye, Cyrille, Alban N. et Alban M., Nicolas, pour leur soutien en toutes circonstances.

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué de quelque manière que ce soit à l'accomplissement de ce travail, trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Résumé

En 2030, la chimie du végétal occupera 30% de la chimie totale en France. Les bioressources offrent l'opportunité de substituer les produits issus de la pétrochimie. Avec un taux de pénétration stable de 25-30% selon les prévisions de l'ADEME, les biotensioactifs constituent une voie de valorisation des produits issus de l'agriculture. Les sources lipophiles et hydrophiles nécessaires à l'obtention de ces composés amphiphiles peuvent être totalement naturelles. Ainsi, la graine de chia de la variété Oruro[®] a été utilisée comme source de la partie hydrophile représentée par le mucilage. Le mucilage surfacique de la graine de cette variété domestiquée en France est constitué de polysaccharides, de protéines et de minéraux. Il peut être extrait de façon efficace par cavitation ultrasonore en milieux aqueux. La composition et les propriétés du mucilage sont liées au temps d'extraction. Ce mucilage constitue une source hydrophile pour l'obtention d'esters amphiphiles. La source lipophile choisie est l'amande de *Irvingia gabonensis* issue d'une variété riche en beurre laurique haut myristique (51%) et laurique (38%). Les triglycérides de ce beurre sont constitués par des mélanges en acides gras saturés. Ce sont de bons candidats pour l'alimentation, la nutrition et aussi l'industrie et la production de biotensioactifs technofonctionnels.

Le travail vise donc la valorisation simultanée du mucilage et de l'huile de *I. gabonensis* par la synthèse de biotensioactifs. Deux voies de synthèse pour l'obtention des esters amphiphiles ont été explorées. La première voie a impliqué la mise en œuvre de la réaction de transestérification entre le glucose et le laurate de méthyle en milieu eutectique profond DES Chlorure de choline/glucose. La deuxième voie fait appel à la catalyse acide en milieu organisé par la mise en œuvre de la réaction d'estérification du glucose ou du mucilage avec les acides gras laurique C12:0, et myristique C14:0 en présence de l'acide dodécylbenzène sulfonique (ADBS). Les études des réactions d'estérification ont préalablement été réalisées à partir du glucose puis transposées au mucilage. L'utilisation de l'ADBS doté d'un double rôle en tant que catalyseur de Brönsted et tensioactif favorise la mise en contact des réactifs, catalyse la réaction la réaction d'estérification entre les hydroxyles du glucose ou des polysaccharides et les groupes carboxyliques des acides gras laurique C12:0 et myristique C14:0 et par conséquent permet l'obtention des esters de glucose de degré de substitution DS=1-2. Les propriétés tensioactives et émulsionnantes sont comparables de ces esters de glucose sont comparables à celles d'un ester commercial Olivem 1000, un mélange d'olivate de sorbitan et d'olivate de cétéaryl. La réaction entre le mucilage de chia Oruro[®] et le mélange d'acides gras de *I. gabonensis* en

présence de l'ADBS a permis une modification structurale profonde du biopolymère. Sa lipophilisation est obtenue par la double monoacylation des sites hydroxyles du mucilage par le mélange d'acides gras laurique C12:0 et myristique C14:0. La viscosité intrinsèque du mucilage acylé est très faible (6,34 dL/g) par rapport à celle du mucilage brut (36,18 dL/g) utilisé en tant que réactif de départ. Il en découle un changement profond de propriétés technofonctionnelles du mucilage acylé.

Mots clés : mucilage, polysaccharides, acides gras saturés, solvant eutectique profond, acide dodécylbenzène sulfonique, esters de glucose, esters de polysaccharides, lipophilisation, biopolymère acylé, degré de substitution DS.

Abstract

In 2030, vegetal-based chemistry will occupy 30% of total chemistry in France. Bioresources offer the opportunity to substitute products from petrochemicals. With a stable penetration rate of 25-30% according to ADEME forecasts, biosurfactants are a way of adding value to agricultural products. The lipophilic and hydrophilic sources needed to obtain these amphiphilic compounds can be completely natural. Thus, the chia seed of the Oruro® variety has been used as a source of the hydrophilic part represented by the mucilage. The surface mucilage of the seed of this variety domesticated in France is made up of polysaccharides, proteins and minerals. It can be extracted effectively by ultrasonic cavitation in aqueous media. The composition and properties of the mucilage are related to the extraction time. This mucilage constitutes a hydrophilic source for obtaining amphiphilic esters. The lipophilic source chosen is the *Irvingia gabonensis* almond from a variety rich in high myristic (51%) and lauric (38%) butter. The triglycerides of this butter are made up of mixtures of saturated fatty acids. They are good candidates for food, nutrition and also industry and production of technofunctional biosurfactants.

The work is therefore aimed at the simultaneous valorization of the mucilage and oil of *I. gabonensis* by the synthesis of biosurfactants. Two synthesis routes for obtaining amphiphilic esters have been explored. The first pathway involved the implementation of the transesterification reaction between glucose and methyl laurate in a deep eutectic medium DES Choline chloride/glucose. The second pathway involved acid catalysis in an organized medium by the implementation of the esterification reaction of glucose or mucilage with lauric C12:0 and myristic C14:0 fatty acids in the presence of dodecylbenzene sulfonic acid (DBSA). The studies of the esterification reactions were previously carried out using glucose and then transferred to mucilage. The use of DBSA with a dual role as a Brönsted catalyst and surfactant promotes the contact of the reagents, catalyzes the esterification reaction between the hydroxyl groups of glucose or polysaccharides and the carboxylic groups of the C12:0 lauric and C14:0 myristic fatty acids and therefore allows the glucose esters of degree of substitution DS=1-2 to be obtained. The surface-active and emulsifying properties of these glucose esters are comparable to those of a commercial Olivem 1000 ester, a mixture of sorbitan olivate and cetearyl olivate. The reaction between chia Oruro® mucilage and the fatty acid mixture of *I. gabonensis* in the presence of ADDBS resulted in a profound structural modification of the biopolymer. Its lipophilization is obtained by the double monoacylation of the hydroxyl sites of the mucilage by the mixture of lauric C12:0 and myristic C14:0 fatty acids. The intrinsic

viscosity of the acylated mucilage is very low (6.34 dL/g) compared to that of the crude mucilage (36.18 dL/g) used as starting reagent. This results in a profound change in the techno-functional properties of the acylated mucilage.

Keywords : mucilage, polysaccharides, saturated fatty acid, deep eutectic solvent, dodecylbenzene sulfonic acide, glucose esters, polysaccharides esters, lipophilization, acylated biopolymere, degree of substitution DS.

Table des matières

Dédicaces	I
Remerciements	III
Résumé	IX
Sigles et abréviations.....	XIX
Introduction générale.....	21
Chapitre I :.....	25
Etat de l’art sur le mucilage de chia, le beurre de <i>Irvingia gabonensis</i> et les esters de sucre.....	25
I.1. La chia.....	26
I.1.1. Description botanique de la graine de chia.....	26
I.1.2. Culture de la variété Oruro®.....	27
I.1.3. Usages traditionnels de la graine de chia.....	28
I.1.4. Composition chimique et valeur nutritionnelle de la graine de chia	28
I.1.5. Extraction du mucilage de chia	32
I.1.6. Composition du mucilage.....	34
I.1.7. Propriétés et applications du mucilage	34
I.2. <i>Irvingia gabonensis</i> (Aubry Lecomte ex O’Rorke) Baill. 1884.....	35
I.2.1. Description botanique de l’espèce <i>I. gabonensis</i>	35
I.2.2. Valeur ajoutée et modèle économique des amandes de <i>I. gabonensis</i>	38
I.2.3. Méthodes d’extraction et teneur du beurre de l’amande de <i>I. gabonensis</i>	39
I.2.4. Composition du beurre de <i>I. gabonensis</i>	41
I.2.5. Propriétés et applications.....	43
I.2.6. Justification du choix de <i>I. gabonensis</i>	43
I.2.7. Chaînes de valeur par la valorisation du mucilage de chia et des acides gras du beurre de <i>I. gabonensis</i> dans la synthèse des esters de sucre	45
I.3. Les tensioactifs	49
I.3.1. Définition.....	49
I.3.2. Classes de tensioactifs	49
I.4. Les esters de sucre d’acides gras	50

I.4.1.	Marché des biotensioactifs	50
I.4.2.	Propriétés et applications.....	53
I.5.	Voies d'obtention des esters de sucre d'acides gras.....	58
I.5.1.	Synthèse par voie enzymatique des esters de sucre.....	59
I.5.2.	Les esters d'oligo et polysaccharides	62
I.5.3.	Synthèse en milieux atypiques	66
I.5.4.	Utilisation de la cavitation ultrasonore et des micro-ondes.....	70
I.5.5.	Les esters de sucre obtenus par voie chimique.....	71
Chapitre II:.....		87
Matériels et méthodes		87
II.1.	Matériels.....	89
II.2.	Méthodes d'extraction.....	90
II.2.1.	Méthode d'extraction du mucilage	90
II.2.2.	Extraction et hydrolyse du beurre de <i>I. gabonensis</i>	92
II.3.	Appareils et méthodes de caractérisation	94
II.3.1.	Caractérisation des graines et du mucilage de chia et des amandes de <i>I. gabonensis</i>	94
II.3.2.	Analyse qualitative et quantitative du beurre de <i>I. gabonensis</i>	100
II.3.3.	Autres méthodes de caractérisation	102
II.4.	Appareils et méthodes d'analyse des propriétés.....	104
Chapitre III :.....		107
Traitements des matières premières : graines de chia Oruro® et amandes de <i>I. gabonensis</i>		107
III.1.	Schéma intégré d'extraction du mucilage et production des graines démucilaginées de chia 108	
III.1.1.	Caractérisation des graines de chia Oruro®	108
III.1.2.	Extraction du mucilage.....	109
III.1.3.	Caractérisation physico-chimique du mucilage.....	115
III.2.	<i>Irvingia gabonensis</i>	123
III.2.1.	Caractérisation de la graine	124
III.2.2.	Pressage et caractérisation du beurre.....	126
III.2.3.	Hydrolyse enzymatique du beurre de <i>I. gabonensis</i>	131

III.2.4. Analyse des phospholipides	135
Chapitre IV :.....	139
Etudes génériques et exploratoires de synthèse des esters de sucre d'acides gras à chaînes courtes	139
IV.1 Cas d'étude de réaction modèle de transestérification du glucose avec le laurate de méthyle en milieu DES profonds par catalyse basique.....	142
IV.1.1. Essais de synthèse des esters de glucose sans ajout de tensioactif ni de solvant	142
IV.1.2. Synthèse par catalyse basique en milieu eutectique.....	144
IV.1.3. Réaction de transestérification entre le glucose et le laurate de méthyle en milieu eutectique	145
IV.1.4. Résultats et discussions	147
IV.2. Cas d'étude de réaction modèle d'estérification du glucose avec les acides laurique, myristique et mélange d'acides laurique et myristique de <i>I. gabonensis</i> en milieu organisé.....	163
IV.2.1. Mise en contact des réactifs	163
IV.2.2. Protocole de synthèse.....	164
IV.2.3. Caractérisation des produits de la réaction par RMN.....	165
IV.2.4. Etude des paramètres de la réaction	180
IV.2.5. Purification des esters de glucose et d'acides gras à chaînes courtes.....	185
IV.2.6. Propriétés physiques et physico-chimiques des esters de glucose et d'acides gras en C12:0, C14 :0 et en mélange C12:0/C14 :0	186
IV.3. Cas d'étude exploratoire de réaction d'estérification du mucilage avec les acides gras à chaînes courtes en C12:0, C14:0 et en mélange C12:0 et C14:0.....	191
IV.3.1. Estimation du nombre d'hydroxyle du mucilage	191
IV.3.2. Etude et mise en œuvre des protocoles de réaction d'estérification du mucilage	192
IV.4.3. Caractérisation des esters de mucilage.....	195
Conclusion générale	210
Bibliographie.....	214
Liste des figures.....	240
Liste des tableaux	244
Annexe	246

Sigles et abréviations

AcL :	Acide laurique
AcM :	Acide myristique
ADBS :	Acide dodécyl benzène sulfonique
AGS :	Acides gras saturés
AGIG :	Acides gras d' <i>Irvingia gabonensis</i>
AM :	Agitation mécanique
AGMI :	Acides gras monoinsaturés
AGPI :	Acides gras polyinsaturés
CMC :	Concentration Micellaire Critique
DES :	Deep eutectic solvent ou solvant eutectique profond
DG :	Diglycérides
DS :	Degré de substitution
DSC :	Differential Scanning Calorimetry
EGL :	Ester de glucose
EGIG:	Ester de glucose d' <i>Irvingia gabonensis</i>
ESAG :	Esters de sucre d'acide gras
E/H :	Eau dans huile (émulsion)
H/E :	Huile dans eau (émulsion)
HMBC :	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC :	Heteronuclear single quantum correlation
IRTF :	Infrarouge à Transformée de Fourier
ISE :	Indice de stabilité des émulsions
LM :	Laurate de méthyle
MG :	Monoglycérides
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
TG :	Triglycérides
US :	Ultrasons
ULT :	Ultraturax

Introduction générale

Le marché mondial des tensioactifs est largement représenté par les tensioactifs d'origine pétrochimique. Ces tensioactifs connus pour être toxiques et non dégradables, visent la performance en tant qu'ingrédients en formulation, sans nécessairement évaluer l'impact du produit fini sur l'environnement. Leur forte utilisation en industrie pose depuis plusieurs années des problématiques environnementales et sanitaires. Dans un contexte de développement durable et en réponse à la mise en place actuelle de la réglementation REACH sur la substitution progressive des produits chimiques les plus dangereux, de nouveaux tensioactifs issus de matières premières naturelles renouvelables sont à développer. Les agroressources offrent ainsi une diversité de matières renouvelables pour une chimie durable (1). Les biotensioactifs qui représentent environ 20% des tensioactifs, devraient atteindre un taux de croissance annuelle de 5,4% jusqu'en 2021, en raison de la forte demande de l'industrie des soins personnels et la sensibilisation accrue des consommateurs à l'égard des produits respectueux de l'environnement. Dans la classe des biotensioactifs, on retrouve les esters de glycérol (2,3) et de polyglycérol, les phospholipides, les alkyles polyglucosides (APG) et les esters de sucre (1,4). Les biotensioactifs à base de sucre représentent environ 30 à 40% de la consommation mondiale de biotensioactifs et constituent ainsi une composante majeure de cette catégorie. Dans ce travail, l'étude est portée sur la synthèse des esters de sucre comparés aux APG par exemple dans le but de valoriser des matières premières végétales et pour des aspects économiques et de performances liés au degré de substitution du sucre.

Les esters de sucre d'acides gras (ESAG) sont des tensioactifs biosourcés présentant un grand intérêt grâce à leurs propriétés valorisables à travers diverses applications dans les industries alimentaire, médicale, pharmaceutique, cosmétique, agriculture, etc. Les ESAG sont des molécules tensioactives non ioniques généralement obtenues à partir de matières premières d'origine animale ou végétale. Ce sont des molécules présentant une grande diversité dans les structures disponibles à cause des groupes hydroxyles du sucre. Du fait de leur caractère biodégradable et non toxique, la forte demande de ces composés ne cesse d'augmenter. En effet, l'intérêt se porte aussi bien sur l'origine naturelle des matières premières utilisées par le besoin de naturalité, les procédés de synthèse que la performance du produit final.

Les ESAG sont généralement obtenus à travers trois grands types de réactions : l'estérification directe, l'estérification indirecte et la transestérification. Les matières premières mises en jeu pour l'obtention des ESAG étant peu réactives, les processus réactionnels doivent être activés. Les

voies de réactions chimiques et/ou enzymatiques doivent être catalysées par voies chimique et/ou enzymatique. L'immiscibilité et l'hétérogénéité des réactifs nécessitent de choisir un milieu réactionnel organisé permettant de faciliter leur mise en contact.

L'obtention des ESAG peut s'avérer difficile dans le cadre notamment du contrôle du degré de substitution aussi bien en synthèse chimique qu'enzymatique. En catalyse chimique, les réactions sont généralement non régiosélectives et conduisent à un degré de substitution non contrôlé. La synthèse par voie enzymatique présente l'avantage de réaliser des réactions régiosélectives et conduit généralement à l'obtention d'esters de sucre de faible degré de substitution. Cette dernière requiert généralement de longues durées de réactions et l'utilisation de solvants organiques capables de dissoudre les réactifs sans désactiver l'enzyme.

Dans le cadre de ce travail, le choix des matières premières rentrant dans la synthèse de ces tensioactifs a constitué une étape importante. Le but était de déterminer deux sources végétales pouvant apporter l'une la partie lipophile et l'autre la partie hydrophile constituant le tensioactif. Le Laboratoire de Chimie-Agro industrielle s'intéresse dans ses axes de recherche à la valorisation des graines oléoprotéagineuses. Le choix s'est porté sur la graine de chia qui a récemment été redécouverte comme alicament à cause de son huile riche en oméga-3 mais aussi de sa teneur en protéines et mucilage surfacique. Ce mucilage fournirait la partie hydrophile par ses complexes polymères protéines, polysaccharides et oligo-éléments. Des travaux sur le lin avaient été initiés dans le cadre de l'extraction de son mucilage au sein du laboratoire (6) ont montré que les graines oléoprotéagineuses à mucilage présentent à la fois un verrou scientifique qui est la récupération de l'huile dans la graine et une opportunité qui est l'extraction du mucilage surfacique de la graine. Le choix de cette ressource végétale a également été motivé par la disponibilité d'une nouvelle variété de la graine de chia. En effet, les graines de chia disponibles en France étaient essentiellement importées d'Amérique du sud car il n'existait pas une variété adaptée au climat tempéré. Ainsi, après 10 ans (2006-2016) de sélection et de recherche, la société Panam (Villemur/Tarn, 31) a créé une variété cultivable en zones tempérées : ORURO®. Protégée depuis 2013 auprès de l'Instance Nationale des Obtentions Végétales (INOV) et reconnue par l'Union Européenne comme nouvel ingrédient, la variété ORURO® a obtenu la notification européenne d'accord de mise sur le marché en mars 2016. 2017 a vu naître le projet FEDER CHIA-EASYNOV 2017-2018 RECH 16004168 soutenu par la Région Occitanie/Pyrénées-Méditerranée dont le but était de créer une filière de valorisation graines de chia (*Salvia hispanica*). Le projet a réuni quatre partenaires : la start-up Agrofun spécialisée dans la mise au point de variétés de chia précoces, le laboratoire de cosmétique biologique

EMERAUDE (Villemur-sur-Tarn-31), COREVA (Auch-32) et le Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA-31). Dans le cadre de ce projet, la récupération du mucilage de la graine de chia s'est révélé une opportunité par sa valorisation en tant que tensioactif. La partie lipophile du tensioactif c'est une source végétale d'origine tropicale. Il s'agit de l'amande de *Irvingia gabonensis* qui est un Produit Forestier Non Ligneux (PFNL) connu pour son fruit et son amande comestibles. Plusieurs institutions se préoccupent du développement du secteur de ces produits et prônent à la fois leur valorisation et leur conservation. *Irvingia gabonensis* présente la particularité d'avoir une teneur en beurre de 56 à 74 % dont 90 % sont les acides myristique et laurique. Ces derniers présentent un intérêt nutritionnel car ils sont thermiquement stables et présentent des propriétés spécifiques liées à leur chaîne courte. Les beurres lauriques sont demandés par les industriels pour les préparations culinaires. La graine de chia et l'amande de *I. gabonensis* constituent deux sources végétales qui peuvent participer de façon efficace au secteur de l'alimentation mais aussi au remplacement des matières fossiles dans l'industrie. Après avoir défini les différentes sources de sucre et d'huile, la démarche scientifique pour parvenir à la synthèse des esters de mucilage d'acides gras a été divisée en quatre parties résumées comme suit :

Dans le premier chapitre, un travail bibliographique sur les matières premières d'une part et les tensioactifs, notamment les esters de sucre, leurs voies de synthèse ainsi que leurs propriétés a été réalisé.

Le second chapitre est dédié aux matériels, méthodes et protocoles utilisés pour l'extraction du mucilage et de l'huile d'une part et ceux mis en œuvre pour la synthèse des esters de sucre et leur caractérisation d'autre part.

Le chapitre 3 est consacré au traitement des matières premières. Il a été question dans cette partie d'une part d'extraire le mucilage de chia par voie humide et le caractériser et d'autre part d'extraire le beurre de *I. gabonensis* comme source lipophile.

Dans le chapitre 4 une démarche d'obtention des esters de sucre a été mise en place. En partant d'un monosaccharide, le glucose, deux types de catalyseurs chimiques ont été étudiés, un catalyseur basique en milieu solvant eutectique profond et un catalyseur acide. Les produits obtenus par cette dernière méthode ont été purifiés et caractérisés. Enfin, les esters de mucilage ont été réalisés en utilisant le catalyseur acide.

Chapitre I :

Etat de l'art sur le mucilage de chia, le beurre de *Irvingia gabonensis* et les esters de sucre

Le présent travail a pour objectif de réaliser la synthèse par catalyse chimique des esters de sucre d'acides gras à partir du mucilage des graines de chia et des acides gras de beurre de *I. gabonensis*.

Avant d'aborder une nouvelle méthodologie, il convient de faire un état de l'art sur les travaux antérieurs concernant ces matières premières, mais aussi, les voies de synthèse des esters de sucre d'acides gras ainsi que leurs propriétés afin de situer notre étude.

I.1. La chia

I.1.1. Description botanique de la graine de chia

La chia (*Salvia hispanica L.*) est une plante herbacée annuelle appartenant à la famille des *Lamiaceae*. C'est une plante sub-tropicale originaire du sud du Mexique et du nord du Guatemala.

La plante de chia est composée de tiges quadrangulaires pouvant atteindre 1 m de haut (Figure I-1). Les feuilles, de 4 à 8 cm de long et 3 à 5 cm de large sont opposées, oblongues et portées par un pétiole de 40 mm de long. Les fleurs sont hermaphrodites (Figure I-2) et donnent naissance à de petites graines groupées par quatre environ. Ces dernières sont ovales, lisses, brillantes et de couleur blanches et foncées. Les graines de chia sont petites, de forme ovale et plate (Figure I-3). Les graines ont une longueur de 2 à 2,5 mm, une largeur de 1,2 à 1,5 mm et une épaisseur de 0,8 à 1 mm (7).



Figure I-1: Plante de chia



Figure I-2 : Fleur de chia



Figure I-3 : Graines de chia

I.1.2. Culture de la variété Oruro®

Aujourd'hui, la chia est principalement cultivée au Mexique, au Chili, en Bolivie, en Argentine, en Bolivie et en Équateur, mais aussi en Australie, en Nouvelle Zélande et au Canada. Depuis quelques années, elle a fait son apparition en Europe, notamment en France. En France, la société Panam a développé la variété Oruro® cultivable en zone tempérée. La graine de chia Oruro® est semée entre fin avril et début mai afin d'éviter les périodes de fraîcheur. Les expériences de culture ont été réalisées dans le sud-ouest de la France et au Centre régional d'agriculture biologique d'Auch (sud-ouest de la France). Les semis ont été réalisés sur un sol argilo-calcaire profond à haute capacité de rétention d'eau. Des engrais organiques constitués de plumes écrasées

sont utilisés comme source d'azote. Les mauvaises herbes sont enlevées de façon mécanique. La floraison a été observée en fin août et la graine a atteint la maturité en fin septembre. La récolte est réalisée lorsque le temps est sec et chaud, entre septembre et octobre (8).

I.1.3. Usages traditionnels de la graine de chia

La graine de chia formait avec le maïs, l'amarante et les haricots le régime alimentaire de base des peuples prés-Colombiens de l'Amérique y compris les populations Mayas et Aztèque. Ils l'utilisaient pour la préparation de recettes médicinales, aliments et peintures. Cahill (9) a écrit une revue sur les utilisations médicinales, alimentaires, artistiques et religieuses de la chia dans le Mexique pré-colombien. Il a montré l'importance de l'utilisation de la graine de chia comme ingrédient dans les boissons et les aliments. D'un point de vue médicinal, la partie la plus utilisée de la plante était la graine. Selon une croyance, les infusions composées de graines de chia entières aidaient à surmonter la résistance à l'absorption de médicaments. La chia était utilisée dans le traitement de plusieurs maladies, particulièrement pour des troubles gastro-intestinaux et respiratoires, contre la fièvre et en tant que stimulant. Sur le plan alimentaire, les graines de chia, entières et moulues, étaient consommées comme nourriture. Les peuples pré-colombiens utilisaient également la chia dans la préparation d'une boisson populaire appelée "chia fresca" (chia frais), qui est encore consommée aujourd'hui. Les graines étaient également pressées pour en extraire l'huile. D'un point de vue artistique, l'huile était utilisée en cosmétique, vernissage et peinture. Sur le plan religieux, les Aztèques recevaient les graines de chia en guise d'hommage annuel aux peuples sous leur domination, et elles étaient utilisées comme offrande aux dieux dans les cérémonies religieuses. En raison de ses implications religieuses la chia avait été interdite sous la règle de l'Europe conquérante. Elle a été redécouverte dans les années 1990 et est depuis lors, répandue en Argentine, en Bolivie, en Colombie, au Guatemala, au Mexique et au Pérou et, en dehors de l'Amérique, en Australie, en Afrique et en Europe (10). La chia reste un élément essentiel de l'alimentation des habitants du Mexique et de plusieurs pays d'Amérique Centrale et devient un aliment de plus en plus populaire présente dans les supermarchés et les magasins d'aliments naturels dans le monde.

I.1.4. Composition chimique et valeur nutritionnelle de la graine de chia

La graine de chia est en plein essor en Europe où elle a été approuvée comme un nouveau produit alimentaire par le Parlement européen et le Conseil de l'Europe en 2009. La chia ne provoque pas d'allergie indésirable, d'effets toxiques ou antinutritionnels. L'attention portée à cette graine s'explique par sa composition remarquable qui représente un atout pour des applications

médicinales et nutritionnelles. La graine est composée de 30-33% d'huile dont 20% d'oméga 6 et 68% d'oméga 3, 15-25% de protéines, 18-30% de fibres dont 26-41% de polysaccharides, (11–14), de vitamines, de minéraux et d'antioxydants. Cette composition fait d'elle un aliment aux propriétés nutritionnelles remarquables.

Le Tableau I-1 présente quelques bienfaits de la graine et de ses constituants. Les graines de chia sont utilisées comme supplément nutritionnel dans les barres de céréales, les pâtes, les dessert, le pain, etc. L'une des principales qualités de cette graine est sa teneur importante en huile particulièrement riche en acides gras insaturés. En effet, la chia est l'une des sources naturelles les plus importantes d'oméga 3. Ces derniers permettent de prévenir les maladies cardiovasculaires, de réduire le niveau des triglycérides et le taux de cholestérol LDL (15). Les propriétés anti-oxydantes des composés phénoliques de la graine agissent contre les agents responsables de dommages cellulaires et donc des maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (16).

Les protéines présentes dans la graine de chia sont en grande partie composées des acides aminés essentiels. Ces protéines fournissent une forte concentration en peptides biologiquement actifs avec des fonctions antihypertenseurs (17,18). Les protéines de chia sont constituées de quatre peptides principaux : l'albumine, la globuline, la prolamine et la glutéline (19–21). La globuline représente 52 % et présente une teneur élevée en acides aminés soufrés, thréonine, histidine, acides glutamique et aspartique (20).

Lorsque la graine de chia est immergée dans l'eau, un gel mucilagineux se développe à sa surface. Ce gel représente 5 à 6 % de la graine et est en grande partie composée de fibres solubles. Ces dernières présentent la capacité de retenir jusqu'à 27 fois la masse de la graine en eau. Le mucilage des graines de chia est considéré comme un ingrédient précieux dans l'industrie alimentaire à cause de ses propriétés physiques. Il peut être utilisé comme agent stabilisateur de mousse dans les produits tels que les mayonnaises, les sauces et les yaourts. Il peut également être utilisé comme agents de suspension, émulsifiant, adhésif ou liant (22–24). Le mucilage pourrait être utilisé dans les produits alimentaires de boulangerie pour remplacer l'huile et les œufs (25). Le mucilage permet d'augmenter la viscosité des aliments favorisant une digestion plus efficace et un prolongement de la sensation de satiété (26).

Tableau I-1 : Composés fonctionnels, valeur nutritionnelle, valeur médicinale et fonctionnalité technologique de la graine de chia

Composé fonctionnel	Teneur (%)	Valeur nutritionnelle	Bienfait sur la santé	Fonctionnalité technologique
Graine entière		Acides gras polyinsaturés, protéines, fibres alimentaires, vitamines, antioxydants, minéraux (27)	<p>Aucune preuve d'effets indésirables et aucune indication d'allergénique (28)</p> <p>Une supplémentation à long terme atténue le risque cardiovasculaire chez les personnes atteintes de diabète de type 2 (29).</p> <p>Réduction de la glycémie postprandiale et prolongation de la satiété (26)</p>	Production de pain, céréale, cookies, chips, desserts, gelées, yaourt (30,31)
Huile	21-33	Riche en acides gras α -linoléique (oméga 3) et α -linoléique (oméga 6)	<p>Baisse de la tension artérielle et des maladies cardiovasculaires (32)</p> <p>Activités anti-inflammatoires (33,34)</p> <p>Action antidiabétique</p> <p>Redistribution des lipides loin du foie ce qui engendre des propriétés cardioprotectrices et hépatoprotectrice (35)</p> <p>Aide à réduire le cholestérol (15)</p> <p>Les oméga 3 et les antioxydants dans la graine de chia pourraient favoriser la réduction de la réponse inflammatoire (36)</p> <p>Protection contre l'arthrose, les maladies auto-immunes et certains cancers (34)</p> <p>Contrôle de la dyslipidémie (37)</p>	<p>Production d'œufs enrichis en oméga 3 (28,38,39)</p> <p>Encapsulation de l'huile essentielle de chia pour des utilisations en tant que nutraceutique (38)</p>

Protéines	15-25	Qualité élevée des protéines due à la présence des acides aminés essentiels : leucine, isoleucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, valine et histidine.	Source potentielle de peptides bioactifs (17,18) Utile à des fins vitales spécifiques : croissance, remplacement des pertes métaboliques et tissus endommagés, reproduction, lactation et bien-être en général (40)	Production d'ingrédients potentiels bénéfiques pour la santé afin d'améliorer les aliments fonctionnels.
Carbohydrates	26-41	Production d'aliments enrichis en fibres (26)	Aide à réduire le temps de digestion des glucides. Réduction de la glycémie postprandiale et prolongation de la satiété (26)	Capacité à contrôler l'eau et moduler la texture d'une vaste gamme de produits alimentaires. Le mucilage peut remplacer environ 25% d'huile ou d'œufs dans un gâteau (25) Peut produire des films comestibles en combinaison avec un concentré de protéines de lactosérum (22) peuvent agir en tant qu'agents épaississant, moussant et émulsifiant (22-24)
Autres		Bonne proportion en tocophérol et stérol (41) Antioxydants, vitamines et minéraux		Source importante d'antioxydants avec des applications commerciales (42)

I.1.5. Extraction du mucilage de chia

Le mucilage est une substance végétale principalement constituée de polysaccharides avec des sucres acides et neutres. Ces derniers présentent la caractéristique de former un gel au contact de l'eau. Le mucilage est expulsé de l'enveloppe épidermique de la graine lorsque cette dernière est mise en contact avec de l'eau. En effet, l'exocarpe gonfle et la cuticule est rompue. Il se produit alors le déversement des composants de la cellule sous forme de mucilage tout autour de la surface de la graine. Cependant, ce mucilage reste fortement lié à la graine (13).

Des études sur la structure de la graine de chia par observation en microscopie électronique à balayage ont montré que celle-ci est entourée d'un péricarpe constitué de la cuticule, l'exocarpe, le mésocarpe, de cellules arrangées verticalement et de l'endocarpe (Figure I-4). Le mucilage est localisé à la surface de la graine plus précisément dans la cuticule et l'exocarpe (13,43,44).

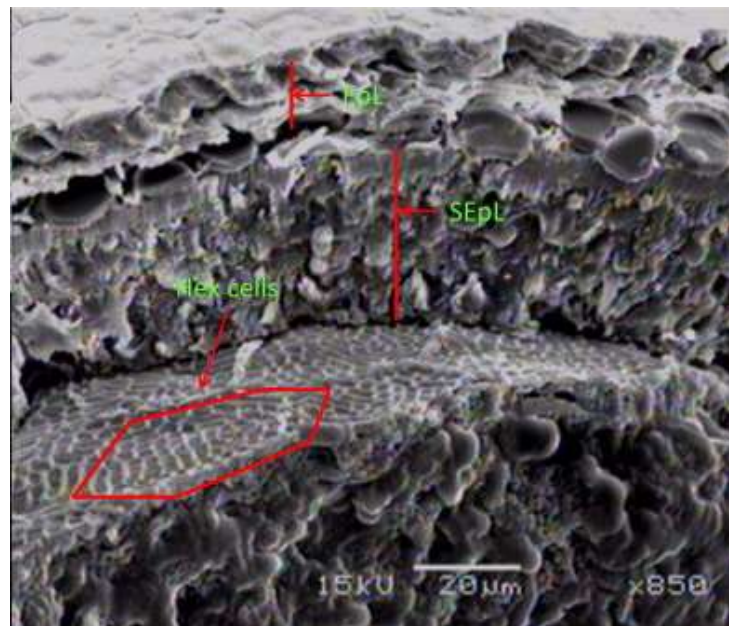


Figure I-4: Microstructure de la graine de chia : coupure transversale (43).

EpL: couche épidermique ou couche externe du tégument

SEpL : seconde couche ou cellule sous épidermiques

Hex cells : cellules isodiamétriques polygonales

Pour extraire ce mucilage, différentes méthodes peuvent être utilisées. Capitani et *al.* ont extrait le mucilage de chia en réalisant dans un premier temps le gonflement du mucilage laissé dans l'eau sans agitation à température ambiante, pendant 4h. Le tout est lyophilisé et le mucilage sec est séparé des graines par tamisage (13). Dans le même sens, le mucilage a pu être extrait par agitation magnétique ou mécanique pendant 2h avant d'être lyophilisé puis tamisé (44). Le mucilage aqueux peut également être séparé des graines par centrifugation avant d'être séché (45). Pour l'extraction du mucilage, un changement de pH peut également être appliqué pour augmenter la solubilité du mucilage (46).

Une autre méthode d'extraction consiste à utiliser la cavitation ultrasonore pour extraire le mucilage localisé à la surface de la graine (6,47–49). Le principe est décrit sur la Figure I-5. Les ultrasons vont induire la formation de bulles de cavitation dans le milieu qui vont imploser et produire des points chauds. Ces derniers peuvent fournir une énergie supérieure à l'énergie d'activation nécessaire à la rupture des liaisons chimiques entre le mucilage et la coque. Ces jets de liquide peuvent aussi avoir un effet érodant à la surface de la graine permettant l'extraction des composés d'intérêt au niveau surfacique.

L'extraction par cavitation ultrasonore permet d'éviter l'utilisation des solutions à des pH élevés, d'une part, et le temps d'extraction est diminué d'autre part. Un autre avantage est l'effet hydrolysant des ultrasons sur le mucilage extrait au cours du traitement. Ce qui induit une diminution de la viscosité du milieu.

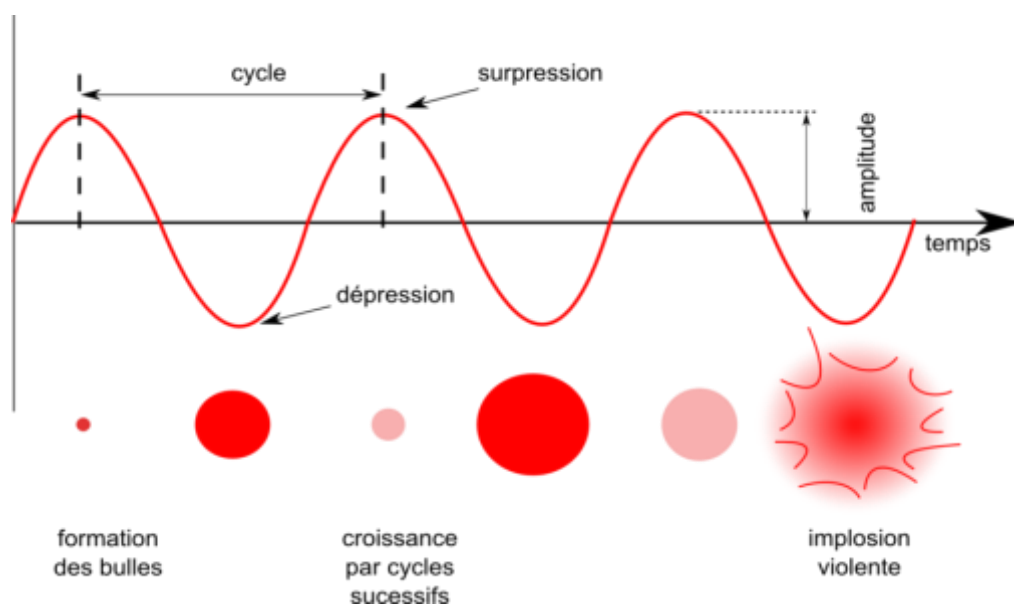


Figure I-5 : Représentation schématique de la croissance puis l'implosion des bulles de cavitation avec l'onde ultrasonore (50)

I.1.6. Composition du mucilage

Selon l'étude réalisée par Capitani *et al.* (2013), le mucilage est composé de 11% protéines, 80% polysaccharides et 8% de minéraux (13). Il constitue une partie des fibres solubles et représente 5 à 12 % de la masse de la graine (13,23,44). Les polysaccharides du mucilage de chia présentent une masse molaire variant de 800 à 2000 kDa (51). Lin *et al.* ont proposé une structure de l'unité de base du polysaccharide du mucilage de chia comme étant un tétra saccharide dont la chaîne principale est une répétition de l'unité (1→4)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-xylopyranosyl sur lequel est branché le résidu de l'acide 4-O-méthyl-α-D-glucuropyranosyl en position 2 du résidu β-D-xylopyranosyl de la chaîne principale. Les monosaccharides β-D-xylose, α-D-glucose et l'acide 4-O-méthyl-α-D-glucuronique ont été obtenus par hydrolyse acide dans la proportion 2:1:1 respectivement (51). Des études plus récentes menées par Muñoz *et al.* (46) et Timilsena *et al.* (44) ont montré que la structure du mucilage est bien plus complexe car on retrouve d'autres monosaccharides tels que le mannose, l'arabinose et l'acide galacturonique.

I.1.7. Propriétés et applications du mucilage

La connaissance de la composition chimique, la structure moléculaire et les fonctionnalités (viscosité, absorption d'eau, solubilité, émulsification ou capacité de gélification) d'un polysaccharide permettent de justifier son application dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. La composition chimique et la conformation influencent les propriétés physico-chimiques et le comportement des phases. Par exemple, les polysaccharides neutres ont généralement une solubilité relativement faible en raison de la présence d'un grand nombre de liaisons hydrogènes qui stabilisent les interactions intra-chaînes et inter-chaînes (52). La formulation de nouveaux produits nécessite souvent la compréhension de la relation structure-fonction des polysaccharides, qui est testée dans des conditions de traitement à haute température ou pression dans des applications alimentaires et biomédicales. Le mucilage constitue une part de fibres alimentaires solubles. Ils peuvent ainsi être consommés comme compléments alimentaires. Ils agissent sur le système digestif et la régulation de la glycémie (53,54).

La solubilité représente la quantité de molécules solubilisées dans une période de temps à une température contrôlée. A des concentrations de 0,15%, 0,25% et 0,50%, le mucilage de chia a présenté une solubilité totale dans l'eau pour des températures comprises entre 30°C et 90°C (46). Ce comportement observé pour le mucilage de chia pourrait s'expliquer par une dispersion complète suivie d'une solubilisation qui favoriserait la pénétration de l'eau dans les particules

gonflées et donc des interactions complètes entre les macromolécules (55). Le mucilage de chia a présenté une capacité de rétention d'eau élevée (23 g d'eau / g de mucilage). La solubilité élevée du mucilage de chia dans l'eau à température ambiante et pH physiologique ainsi que sa capacité de rétention de l'eau révèle que le mucilage de chia pourrait trouver des applications dans des formulations alimentaires en tant qu'agents texturant, stabilisant, gélifiant, émulsifiant, liant et épaississant dans les industries alimentaire, cosmétique et industrielle. Le mucilage de chia présente la capacité de former des solutions très visqueuses à faibles concentrations. Les propriétés émulsifiantes et l'indice de stabilité des émulsions représentent des propriétés fonctionnelles des protéines et polysaccharides dans les émulsions pour des applications alimentaires. Les propriétés émulsifiantes et l'indice de stabilité des émulsions augmentent avec l'augmentation de la concentration de mucilage (44). Le mucilage de chia possède ainsi la capacité de stabiliser des émulsions.

En résumé, l'étude bibliographique sur la graine de chia révèle l'engouement autour de cette culture du fait de sa composition et de ses propriétés. Actuellement, la société Panam fournit des graines issues de l'agriculture conventionnelle et biologique de la variété ORURO[®]. Les produits sont vendus sous forme de graines pour des formulations alimentaires mais aussi sous forme d'huile à cause de sa richesse en oméga 3. Le travail sur la domestication et la diversification des semences de graines de chia par des études de la bioaccumulation des constituants majeurs et mineurs de la plante est en cours de réalisation par le groupe Oléo-Protéo-Chimie du LCA en collaboration avec la CACG sur le site expérimental de la CACG à Masseube dans le Gers. Les premiers résultats montrent que cette espèce peut s'inscrire dans un programme de développement des agricultures diverses et performantes et répond aux Stratégies Régionales et Européennes de l'Innovation (8).

I.2. *Irvingia gabonensis* (Aubry Lecomte ex O'Rorke) Baill. 1884

I.2.1. Description botanique de l'espèce *I. gabonensis*

I. gabonensis est un arbre appartenant à la famille des *Ivingiaceae* que l'on retrouve dans les forêts humides et chaudes de l'Afrique Centrale et de l'Afrique de l'Ouest (56). L'arbre de *I. gabonensis* a une hauteur pouvant atteindre et dépasser 40 mètres. Ses différentes parties (tronc, racines, feuilles et fruits) peuvent être utilisées dans le traitement de nombreuses maladies aussi bien en médecine traditionnelle que moderne (57–59). Le fût est droit et ne dépasse

qu'exceptionnellement 1 m de diamètre. Les feuilles simples, alternes, sont brillantes sur les deux faces. Elles mesurent 6 à 12 m de longueur et 4 à 6 cm de largeur. Les fleurs sont petites, jaunes verdâtre, pentamères et hermaphrodites.

Le fruit de *I. gabonensis* ressemble à une mangue « domestiquée » qui passe de la couleur verte à jaune à maturité (Figure I-6). Il mesure 6 à 7 cm de long et 4 à 5 cm de largeur. Communément appelée « mangue sauvage africaine », ou « mangue sauvage douce », le fruit de *I. gabonensis* est constitué d'une pulpe comestible très fibreuse riche en vitamine A (280mg/100g de fruit frais) et C (51-76 mg/100g) qui peut être utilisée pour fabriquer des jus, vins, confitures et gelées (60). La Figure I-7 présente le schéma de traitement des fruits pour l'obtention des amandes de *I. gabonensis*.



Figure I-6 : Coupe transversale du fruit de *I. gabonensis*

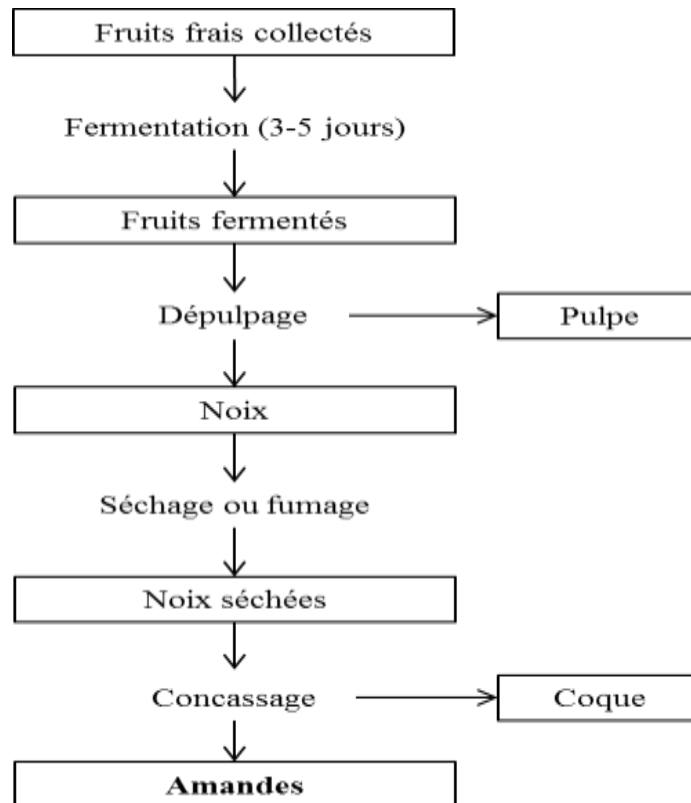


Figure I-7 : Diagramme de production d'amande de *I. gabonensis* (61)

Le noyau contient une amande aplatie utilisée comme condiment et épaississant en cuisine (62,63). Au Gabon par exemple, les amandes (Figure I-8) sont broyées pour fabriquer une pâte appelée « Odika » utilisée comme ingrédient pour la préparation de sauces.



Figure I-8 : Amandes de *I. gabonensis*

Il est présent en Angola, Cameroun, Congo, Côte d'Ivoire, Gabon, Ghana, Guinée-Bissau, Guinée Equatoriale, Libéria, Nigéria, République Centrafricaine, Ouganda, République Démocratique du Congo, Sao Tomé et Príncipe, Sénégal, Sierra-Leone, Soudan, etc.

I.2.2. Valeur ajoutée et modèle économique des amandes de *I. gabonensis*

En 1996, s'est tenue une conférence sur la domestication et la commercialisation des PFNL pour les Systèmes de l'Agroforesterie au cours de laquelle des recommandations ont été données (64). Les institutions présentes ont reconnu que :

- Les PFNL jouent un rôle traditionnel dans l'alimentation des peuples des régions tropicales ;
- Les PFNL jouent un rôle important dans la sécurité alimentaire, spécialement pendant les années sèches ;
- Les PFNL jouent un rôle crucial dans la santé et la nutrition des populations des régions tropicales
- La vente des PFNL permet à la population d'acheter des intrants essentiels pour soutenir l'agriculture ;
- A travers la domestication, de nombreux PFNL peuvent être améliorés qualitativement et quantitativement afin de les rendre plus attractifs aux agriculteurs, plus commerciables et contribuer à la réduction de la malnutrition et de la pauvreté.

On entend par PFNL des produits d'origine biologique (faune et flore) autres que le bois, provenant de la forêt naturelle, artificielle ou des systèmes agroforestiers (65). L'ICRAF a ainsi identifié *I. gabonensis* comme une espèce d'arbres fruitiers sauvages prioritaire à la domestication (FAO, 1996). La domestication de *I. gabonensis* présente plusieurs intérêts d'ordre socioéconomique, environnemental et nutritionnel.

Sur le plan économique : le marché des amandes de *I. gabonensis* est estimé à 50 millions de dollars de chiffre d'affaires. La commercialisation s'effectue au niveau régional entre les pays tels que le Nigeria, le Bénin, le Gabon et le Cameroun. Les amandes de *I. gabonensis* font également l'objet d'un commerce international, de l'Afrique vers le Royaume-Uni et les Etats-Unis. Le marché reste cependant limité d'où son insertion dans le programme dédié à la valorisation des PFNL. Les amandes de *I. gabonensis* présentent un potentiel de développement socioéconomique pour les communautés locales de la région d'Afrique Centrale et d'Afrique de l'Ouest. Sur le plan environnemental, le développement du secteur des PFNL permet de limiter le braconnage dans

ces régions. Dun point de vue social, la vente informelle des PNFL génère des revenus pour de nombreux ménages qui servent à l'approvisionnement en produit de premières nécessités et à la scolarisation des enfants.

I.2.3. Méthodes d'extraction et teneur du beurre de l'amande de *I. gabonensis*

Le beurre a été extrait selon diverses méthodes : soxhlet, extractions de Folch, Bligh et Dyer, pressage, extraction enzymatique (66–70). Les résultats obtenus pour ces différentes méthodes sont regroupés dans le Tableau I-2. Le beurre de *I. gabonensis* est solide à température ambiante et de couleur jaune (71). On parlera donc de beurre de *I. gabonensis* tout au long de ce travail.

- Méthode par extraction au soxhlet

L'extraction est réalisée sur 40 g d'amandes de *I. gabonensis* en utilisant l'éther de pétrole comme solvant, à une température comprise entre 40 et 60°C pendant 5h. Le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif et le beurre est passé sous un courant d'azote. Le beurre des amandes a été extrait par la méthode du soxhlet afin de déterminer la teneur en matière grasse dans les amandes. Le résultat a été exprimé en pourcentage de lipides dans la matière sèche de la poudre d'amandes (67,69). Matos et *al.* ont obtenu des teneurs en beurre de 62,7 % à 73,8 % (67) et Silou et *al.* ont obtenu des teneurs comprises entre 56 % et 69 % (69).

- Extraction par la méthode de Folch

Le beurre des amandes a été extrait selon la méthode de Folch (1957) (72). Cette méthode chimique permet d'obtenir les lipides à froid dans un mélange anhydre chloroforme : méthanol (2:1 ; v/v). Les lipides sont récupérés par élimination du solvant dans un évaporateur rotatif à 45°C, puis séchés jusqu'à poids constant dans une étuve à vide à 90°C pendant 1h et pesés. Matos et *al.* ont obtenu des teneurs en beurre de 51 % et 57 % (67) et Silou et *al.* ont obtenu des teneurs comprises entre 60 et 62 % (69).

- Extraction par la méthode de Bligh et Dyer

La méthode de Bligh et Dyer est semblable à la méthode de Folch (1059) (73), mais elle tient compte de l'importance de l'eau dans l'échantillon. 100 mg de poudre d'amandes sont homogénéisés avec un mélange de chloroforme : méthanol (1:1 v/v) et de l'eau. On obtient deux phases, une couche aqueuse (méthanol-eau) et une couche organique (chloroforme). Le beurre est

contenu dans les extraits de chloroforme. Les rendements d'extractions obtenus après évaporation du chloroforme sont de 56,5 % et 60,2 % pour l'étude réalisée par Matos et *al.* (67). Silou et *al.* ont obtenu des teneurs en beurre comprises entre 57 et 59 % (69).

- **Méthode d'extraction enzymatique par voie aqueuse**

L'utilisation des enzymes comme moyen d'extraction du beurre avait pour but d'éviter l'utilisation des solvants organiques et de réaliser des extractions successives. Le protocole d'extraction a été réalisé avec une dispersion en milieu aqueux de farine d'amandes de *I. gabonensis* traitée successivement et séparément avec trois enzymes : une protéase (Alcalase ®), une pectinase (Pectinex ®), un mélange d'enzymes de dégradation de la paroi cellulaire (Viscozyme ®). Le beurre est récupéré par centrifugation. Le rendement d'extraction, calculé par rapport à la quantité de beurre dans l'amande, a donné respectivement 34,8%, 42,2% et 68,0% lorsque l'Alcalase, le Pectinex et la Viscozyme sont ajoutés séparément. Sans enzyme, le rendement d'extraction à l'eau est de 27,4%. Le protocole d'extraction optimisé consiste à hydrolyser les parois cellulaires de la farine d'amandes dispersée dans l'eau avec 2% de Viscozyme pendant 18h puis d'ajouter 1% d'Alcalase environ au mélange et incubé le tout pendant 2 h. Le beurre est récupéré après centrifugation du milieu (74). Dans ces conditions de traitement, le rendement d'extraction, calculé par rapport à la quantité de beurre dans la graine, est de 89,6%.

- **Méthode d'extraction par pressage**

Matos et *al.*, ont réalisé un pressage à chaud de 100 mg de poudre d'amandes préalablement chauffés à 110°C dans un autoclave pendant 20 min sous une pression de 1 bar. Le rendement d'extraction obtenu est de 34,5% (67). Ogunsina et *al.* (75) ont étudié l'effet du pré-traitement des amandes dans le processus de pressage. Les paramètres étudiés étaient : les tailles des particules (fines de 2 mm et grossières de 4,75 mm), l'humidité (4%, 6% et 8%), la température de chauffe (30°C, 40°C et 50°C) la durée de chauffe (15 min, 35 min et 45 min) et la pression (5 MPa, 10 MPa et 15 MPa). L'extraction a été réalisée à l'aide d'une presse hydraulique. Le meilleur rendement (36,6%) a été obtenu pour de fines particules de 2 mm d'amandes à 4% d'humidité, une pression de 15 MPa à 50°C.

Tableau I-2: Rendements d'extraction (en %) du beurre extrait de l'amande en fonction de la méthode d'extraction

Techniques d'extraction	Womani et al., 2008(74)	Matos et al., 2009 (67)	Silou et al., 2011 (69)	Ogunsina et al., 2014 (75)
Soxhlet		62-74	56-69	
Folch		51-57	60-62	
Bligh et Dyer		56-60	57-59	
Enzymatique	68-90			
Pressage		34-35		37

Les travaux décrits sur l'extraction du beurre de *I. gabonensis* montrent que cette amande est une bonne source oléagineuse. L'extraction par solvant révèle que la méthode par soxhlet permet d'extraire plus de beurre que les méthodes de Folch et Bligh et Dyer. L'extraction enzymatique par voie aqueuse est optimisée pour des extractions successives avec des enzymes différentes. Enfin, le pressage des amandes par voie mécanique sans cuisson est meilleur que le pressage avec cuisson.

I.2.4. Composition du beurre de *I. gabonensis*

La teneur en beurre dans l'amande de *I. gabonensis* varie entre 56 et 74 %. Le profil glycérique déterminé par Silou et al. (69) et Yamoneka et al. (70) ont révélé que les triglycérides prépondérants dans le beurre de *I. gabonensis* sont respectivement LMM, LLM, MMM, MMP et LLL (L, M, et P, représentant respectivement les chaînes grasses de l'acide laurique, myristique, palmitique attaché au glycérol). Cette composition est en accord avec le profil des acides gras obtenu par analyse chromatographique en phase gazeuse (CPG) sur le beurre de *I. gabonensis* (Tableau I-3). L'analyse en CPG révèle que le beurre est constitué de cinq acides gras saturés représentant 82 % à 98 % des acides gras totaux. Les acides laurique (C12:0) et myristique (C14:0) sont majoritaires (66,67,76). Les différences observées dans les teneurs en acides gras des amandes peuvent s'expliquer par l'origine, les méthodes d'extraction et d'analyse du beurre. Etong et al. ont obtenu une composition en acide laurique (39,4%) supérieure à celle de l'acide myristique (20,5%). Ces teneurs sont généralement obtenues pour *Irvingia wombulu* (48% en acide laurique et 43 % en acides myristique, obtenu par Silou et al.) (69) et pour *Irvingia smithi* (51 % en acide laurique et 33 % en acide myristique, résultat décrit par Loumouamou et al., 2013) (77).

Tableau I-3 : Profil des acides gras du beurre de *I. gabonensis* déterminé en CPG

Acides gras	Matos et <i>al.</i> , 2009 (67)	Silou et <i>al.</i> , 2011 (69)	Ogunsina et <i>al.</i> , 2012 (76)	Loumouamou et <i>al.</i> , 2013 (77)	Etong et <i>al.</i> , 2014 (66)
C10 : 0	1,34	2,05		3,67	ND
C12 : 0	39,37	48,54	27,63	51,85	39,40
C14 : 0	50,92	43,43	61,68	33,84	20,50
C16 : 0	4,97	3,37	7,49	3,78	10,30
C18 : 0	0,73	0,59	0,81	0,44	11,40
C18 : n1-9	1,82	1,71	2,12	3,18	6,90
C18 : 2n-6	0,49	0,31	0,27	0,51	6,40
AGS*	97,33	97,98	97,61	89,91	81,60
AGMI*	1,82	1,71	2,21	3,18	6,90
AGPI*	0,49	0,31	0,27	0,51	6,40

*AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés

Si l'on regarde les données sur la production des principaux acides gras des huiles et matières grasses et leurs sources majeures (Tableau I-4), on remarque que les acides laurique et myristique sont parmi les sept principaux acides gras majeurs (78). Les acides laurique et myristique se retrouvent principalement dans le palmiste, le coprah, les beurres, les huiles laurique et le palme. La famille des *Irvingiaceae* représente ainsi une opportunité pour fournir ces deux acides gras.

Tableau I-4 : Acides gras majeurs (en millions de tonnes) dans les huiles et matières grasses et les sources principales

Acides gras	Tonnage (MT)	Pourcentage (%)	Source de tonnage (MT)
Oléique (C18:1)	38,4	35,3	Palme (10,4) ; Colza (7,7) ; Soja (6,4) ; beurre de lard, blt (6,2)
Linoléique (C18:2)	31,9	29,4	Soja (15,0) ; tournesol (5,2) ; palme (2,6) ; canola (2,5)
Palmitique (C16:0)	21,7	20,0	Palme (11,4) ; soja (2,8) ; coton (1,0), blt (4,2)
Stéarique (C18:0)	5,5	5,1	Soja (1,1) ; palme (1,0) ; blt (2,3)
Linoléique (C18:3)	3,5	3,2	Soja (1,9) ; canola (1,4)
Laurique (C12:0)	2,0	1,6	Palmiste (1,1) ; coprah (0,7) ; beurre (0,2)
Myristique (C14:0)	1,8		Beurre (0,7) ; huiles lauriques (0,6) ; palme (0,3)

Blt : beurre, lard, tallow (suif)

I.2.5. Propriétés et applications

L'amande de *I. gabonensis* présente des avantages considérables nutritionnels. Elle est utilisée en alimentation pour la préparation de sauces. L'étude réalisée par Ngondi et *al.* a permis de montrer l'efficacité de l'amande de *I. gabonensis* dans la gestion de l'obésité. L'expérience a été réalisée sur 40 cas de sujets humains obèses. 28 personnes avaient reçu 1,05 g d'extrait de graines de *I. gabonensis* trois fois par jour pendant un mois et 12 étaient sous placebo dans le même temps. Les résultats obtenus ont montré que les patients qui avaient reçu l'extrait de graines de *I. gabonensis* présentaient une diminution suffisante de la glycémie à jeun, des triglycérides, du cholestérol total, du cholestérol LDL et une augmentation du cholestérol HDL. Par contre, le placebo n'a montré aucune modification de la glycémie et des composants lipidiques (79). Cette étude a montré que les graines de *I. gabonensis* pourraient être utilisées comme antidiabétique.

L'amande de *I. gabonensis* est également pressée pour produire un beurre comestible. Ce beurre est actuellement utilisé comme agent hydratant et de conditionnement de la peau dans la formulation de produits cosmétiques. Il pourrait également être utilisé pour la fabrication de produits pharmaceutiques, de savons (80,81) et avoir des applications considérables dans l'industrie.

I.2.6. Justification du choix de *I. gabonensis*

Dans le cadre de cette étude, l'amande de *I. gabonensis* a ainsi été choisie pour sa biodisponibilité lipidique. En effet, comme il a été montré dans l'étude bibliographique, les amandes de *I. gabonensis* ont une forte teneur en matière grasse (56-74%). Les amandes donnent un beurre hautement saturé de 82% à 98%. Les espèces *I. wombulu* et *smithii* sont classées comme laurique-myristique car elles fournissent des teneurs élevées en acide laurique de l'ordre de 49% (69) et 52% (77) respectivement. L'espèce *I. gabonensis* fournit des beurres myristique-laurique avec des teneurs très élevées en acide myristique de l'ordre de 51-62%. Fondamentalement, la nature des acides gras répartit les huiles végétales en huile « laurique », huile « oléique » et huile « érucique ». De par sa composition, *I. gabonensis* fournit principalement les acides gras laurique constitués par l'acide laurique C12:0 et l'acide myristique C14:0. Les sources principales végétales de production de cette catégorie d'huile sont le palme par l'huile de palmiste et le coco (Tableau I-5).

Tableau I-5 : Production mondiale des huiles de palmiste et de coco et leurs teneurs en acides laurique et myristique

	Production mondiale 2019/2020 (Millions de Tonnes)*	Acide laurique C12:0 (%)	Acide myristique C14:0 (%)
<i>I. gabonensis</i>	-	28-62	51-60
Palmiste	20,17	45-55	14-18
Coco	5,18	45-53	17-21

*Source : USDA consulté le 27 mai 2020 (Oilseeds :World Markets and Trade USDA FAS)

Les huiles laurique se distinguent des autres huiles par le fait qu'elles sont largement utilisées pour des applications alimentaires et non alimentaires. L'huile de palmiste et l'huile de coco sont principalement utilisées à des fins alimentaires, respectivement 83% et 61% de l'utilisation totale (82). Une grande partie de l'utilisation totale restante est destinée à l'industrie oléochimique. Les applications alimentaires des huiles lauriques comprennent la friture peu profonde, la substitution du beurre de cacao, la formulation de margarine et de pâte à tartiner, les glaces, les crèmes à fouetter non lactières et les laits fourrés.

L'utilisation des huiles laurique dans la formulation des margarines est liée à leurs propriétés de fonte rapide. De plus, les huiles lauriques sont une source de triacylglycérols à chaîne moyenne, qui sont plus rapidement absorbés, éliminés du sang et métabolisés par rapport aux acides gras à longue chaîne. Le distillat de palmiste (un sous-produit du raffinage de l'huile de palmiste) est une source de MCT (Medium-Chain-Triglycéride) contenant des acides laurique et myristique. Les huiles MCT sont stables contre l'oxydation car elles contiennent des acides gras saturés et présentent une teneur en calories plus faibles que les huiles brutes. Les huiles MCT peuvent être pulvérisées sur les produits tels que les épices ou l'amidon afin d'éviter un goût désagréable.

Les producteurs de chocolat sont à la recherche d'huiles et de beurres pouvant substituer le beurre de cacao du fait de son prix élevé et de l'approvisionnement irrégulier. Le substitut doit avoir une caractéristique de fonte prononcée, être physiquement stable après cristallisation et avoir un goût fade. Les huiles lauriques sont adaptées à cet effet. Le beurre de cacao contient des quantités presque égales d'acides palmitique, stéarique et oléique et fond entre 32°C et 35°C. Enfin, les huiles laurique sont utilisées à des fins non alimentaires en savonnerie et détergence. Ils sont également utilisés dans les cosmétiques et les produits de soins personnels.

Enfin, l'apport de l'acide myristique via l'alimentation permettrait de réguler de nombreux mécanismes cellulaires par sa capacité à acyler les protéines. De plus, il a un avenir court dans la cellule car il est bêta-oxydé et/ou allongé en acide palmitique (83,84).

I.2.7. Chaînes de valeur par la valorisation du mucilage de chia et des acides gras du beurre de *I. gabonensis* dans la synthèse des esters de sucre

Les acides laurique et myristique sont utilisés pour la fabrication de tensioactifs à base de sucre. Par exemple les groupes Sisterna (C.V. Roosendaal, Pays-Bas) Ryoto (Mitsubishe-Kasei Food Corporation, Tokyo Japon) commercialisent des esters de sucre d'acides gras pour des applications alimentaire, pharmaceutique, cosmétique et cosmaceutique, détergence.

Le produit L70-C de Sisterna obtenu à partir du saccharose et de l'acide laurique d'origine végétale est décrit comme le meilleur agent moussant d'esters de saccharose grâce à sa courte chaîne devant ceux obtenus par les acides palmitique et stéarique. L'ester de saccharose L70-C (laurate de saccharose) est de plus, un anti-caries qui inhibe la croissance de *Streptococcus mutans* et peut être utilisé dans les soins dentaires.

Le groupe Ryoto commercialise le myristate de saccharose de qualité alimentaire (M-1695) et cosmétique (C-1416) ainsi qu'une grande variété de laurate de saccharose (

Tableau I-6). Le Tableau I-7 décrit l'utilisation du laurate de saccharose dans différents domaines

Acide gras	Nom commercial	HLB	Teneur en monoester (%)	Applications
C12:0	L-195	1	1	Alimentaire
C12:0	L-595	5	30	Alimentaire
C12:0	LWA-1570	15	70	Alimentaire
C12:0	L-1695	16	80	Alimentaire
C12:0	C-1216	16	80	Cosmétique et soins personnels
C12:0	C-1215L	15	70	Cosmétique et soins personnels
C14:0	M-1695	16		Alimentaire
C14:0	C-1416	16	80	Cosmétique et soins personnels

d'applications ainsi que les effets techniques qui en découlent.

Tableau I-6 : Applications esters de saccharose des acides laurique et myristique commercialisés

Acide gras	Nom commercial	HLB	Teneur en monoester (%)	Applications
C12:0	L-195	1	1	Alimentaire
C12:0	L-595	5	30	Alimentaire
C12:0	LWA-1570	15	70	Alimentaire
C12:0	L-1695	16	80	Alimentaire
C12:0	C-1216	16	80	Cosmétique et soins personnels
C12:0	C-1215L	15	70	Cosmétique et soins personnels
C14:0	M-1695	16		Alimentaire
C14:0	C-1416	16	80	Cosmétique et soins personnels

par Ryoto.

L'étude bibliographiques sur le mucilage des graines de chia et le beurre de *I. gabonensis* révèlent les potentialités de ces deux ressources naturelles sur les plans économique, social, environnemental, nutritionnel et industriel. Du fait de leur composition et propriété, le mucilage de chia et le beurre de *I. gabonensis*, nous avons mis en place une chaîne de valeur par la valorisation de ces matières par le développement d'esters de mucilage d'acides laurique et myristique.

Tableau I-7 : Applications diverses des esters de saccharose des acides laurique et myristique commercialisés par Ryoto

Applications	Laurate de saccharose	Effets
Alimentaire		
Confiserie (chocolat)	L-195	Abaisse la viscosité et favorise le revêtement de la trempe. Doit être utilisé conjointement avec de la lécithine. Améliore la déformation thermique du chocolat et réduit la séparation de l'huile. Augmente la résistance à l'eau et empêche la floraison du sucre.
Produits laitiers et substituts (Blanchissant concentré au lait, crème fouettée)	Tous les types	Empêche l'amincissement et le dégraissage en fournissant une émulsification stable. Empêche la séparation de l'eau et donne une bonne dispersion. Améliore la qualité stand-up et fournit un dépassement adéquat.
Graisses et huiles transformées : Margarines et matières grasses émulsionnées sans eau	L-195	Produit une émulsion E/H à faible teneur en matières grasses. Améliore le crémeux et la capacité de rétention d'eau et est efficace en anti-éclaboussures. Fournit une émulsion stable, améliore le crémeux et la capacité de rétention d'eau.
Raccourcissement Matières grasses émulsionnée	Tous les types Tous les types	En raison de l'excellente capacité d'émulsification H/E, une émulsion H/E est obtenue à un large rapport H/E.
Epices, assaisonnements en sauce et lait de soja en poudre. Saveurs, antioxydants et conservateurs	L595	Empêche la prise des aliments hygroscopiques en poudre, améliore la fluidité et la solubilité dans l'eau. Utilisé comme agent solubilisant et dispersant pour les matières insolubles dans l'eau
Détergents	LWA-1570	Utilisé pour le nettoyage des légumes et des fruits et celui des biberons pour bébé en raison de sa haute sécurité

Médicaments	Tous les types	Ne présente aucune toxicité orale ou percutanée et aucune irritation des muqueuses. Ne réduit pas l'efficacité des composés phénoliques ou des antibiotiques, n'a pas de point de trouble. Convient pour solubiliser et stabiliser les vitamines liposolubles et divers antibiotiques. Également utilisé comme lubrifiant, désintégrateur, liant et agent de remplissage pour divers comprimés.
Produits de beauté	Tous les types	Donne à la peau douceur en fournissant un film mince sur la peau et conservant ainsi une hydratation adéquate. Par conséquent, utilisé comme agent apaisant dans les crèmes pour la peau et les cheveux, les crèmes de soin, les crèmes de nuit, les lotions, les shampooings, les crèmes nettoyantes, les crèmes à raser, les lotions pour les cheveux et les rouges à lèvres. Également utilisé pour les dentifrices comme agent moussant.
Plastiques	LWA-1570	Efficace comme inhibiteur de blocage, inhibiteur de trouble et agent antistatique
Textiles	LWA-1570	Utilisé comme agent de finition doux et agent antistatique pour divers types de textiles

I.3. Les tensioactifs

I.3.1. Définition

Les tensioactifs ou agents de surface sont des molécules amphiphiles qui agissent en diminuant la tension interfaciale entre deux milieux non miscibles. Ce sont des molécules dont la « tête » polaire, de nature variée, présente un caractère hydrophile et la « queue » lipophile est une chaîne carbonée (Figure I-9).

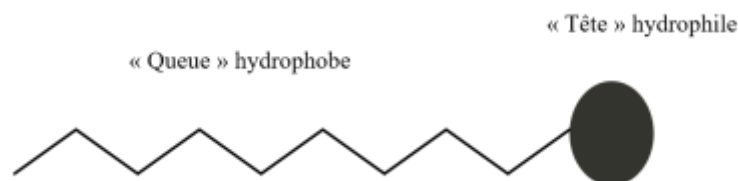
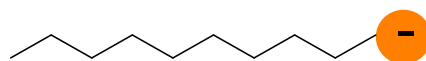


Figure I-9 : Représentation schématique d'une molécule tensioactive

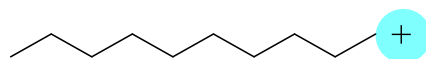
I.3.2. Classes de tensioactifs

L'une des classifications la plus courante des tensioactifs est basée sur le caractère ionique du groupe hydrophile (4,85). Ainsi, on distingue :

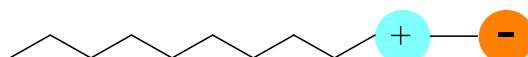
- Les tensioactifs anioniques qui libèrent une charge négative en solution aqueuse. C'est le cas des sulfonates et sulfates, carboxylates et savons, phosphates et phosphonates.



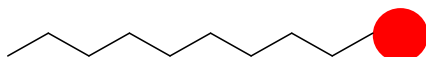
- Les tensioactifs cationiques dont la partie hydrophile est chargée positivement. On peut citer les amines et sels d'ammonium, etc



- Les tensioactifs amphotères ou zwitterioniques contiennent à la fois des groupes acides et basiques et s'ionisent en fonction du pH du milieu. En milieu basique ils se comportent comme des anions et en milieu acide comme des cations en milieu acide. C'est le cas des bétaines et des phospholipides par exemple.



- Les tensioactifs non ioniques qui ne s'ionisent pas en solution aqueuse. Ils peuvent être classés en fonction de la liaison reliant les parties hydrophile et lipophile du tensioactif. On distingue ainsi les tensioactifs à liaison esters, éthers et amides.



I.4. Les esters de sucre d'acides gras

I.4.1. Marché des biotensioactifs

Le choix de synthétiser des esters de sucre par rapport à d'autres biotensioactifs tels que les alkylpolyglucosides, les phospholipides par exemple est motivé par des raisons économiques, le contrôle du degré de substitution et les propriétés découlant de ces composés. Les esters de sucre d'acides gras ou ESAG sont des molécules tensioactives non ioniques issues de matières premières renouvelables d'origine naturelle. Ils peuvent être obtenus à partir d'une tête hydrophile constituée d'un sucre et d'une queue lipophile (triglycérides, acides gras ou esters méthyliques) reliées entre eux par une liaison ester.

L'intérêt porté sur ces molécules réside dans le fait que les matières premières utilisées sont des bioressources. En effet, en 2015, l'Organisation des Nations Unies a adopté un nouveau programme de développement durable reconnu selon les Objectifs de Développement Durable (ODD). Dans le contexte de ce programme, l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) a défini cinq domaines thématiques prioritaires dans la stratégie de développement :

- L'ambition globale d'atteindre la sécurité alimentaire dans un contexte de transitions ;
- Les agricultures diverses et multiperformantes ;
- Les systèmes agricoles et forestiers face au défi climatique ;
- Une alimentation saine et durable ;
- Des bioressources aux usages complémentaires.

Le dernier domaine prévoit qu'en 2030, la chimie du végétal occupera 30% de la chimie totale dans les produits chimiques issus d'une association de biomasse contre 5% en 2005.

La chimie du végétal constitue l'un des piliers de ce programme qui irrigue l'un des 12 principes de la chimie verte. Elle repose sur l'utilisation de ressources végétales en remplacement des ressources fossiles pour la fabrication de produits à destination de la chimie et de ses marchés applicatifs. La bioéconomie ou l'économie de la photosynthèse permet de générer des données sur les marchés actuels et de formuler des hypothèses positives sur l'évolution des filières et des marchés des produits biosourcés et de donner des recommandations.

L'ADEME (Agence de l'Environnement et de la maîtrise de l'Energie) a réalisé une étude de bioéconomie à l'horizon 2020-2030 des filières des produits biosourcés non énergétiques et non alimentaires innovants provenant, pour tout ou partie, de matières premières renouvelables issues de la biomasse.

L'étude concerne les différents produits issus des matières premières de premières transformations de la biomasse (amidon, huiles, cellulose, fibres, saccharose, etc.) desservant un large panel de marchés applicatifs (tensioactifs, solvants, résines, encres, peintures et vernis, détergents, produits cosmétiques etc.).

En 2012, environ 1,2% de la surface agricole utile (SAU) française était dédiée à la culture de produits de première transformation destinés à des usages en chimie et matériaux, aussi bien pour la France qu'à l'export. La part dédiée aux huiles était de 0,20%. Le scénario de la bioéconomie prévoit que la surface agricole utile sera de 2,64 % en 2030 dont 1,82 % sera dédié la production des huiles.

Concernant les produits simples, issues de la transformation et formulation, les tensioactifs comptent parmi les marchés sur lesquels les produits biosourcés sont bien développés et dont le taux de pénétration est relativement stable et resterait limité à l'avenir. Cela s'explique par la croissance du marché des cosmétiques et des détergents qui constituent des produits formulés. En effet, les cosmétiques ne consomment que les tensioactifs totalement biosourcés. Les détergents quant à eux représentent 2/3 des débouchés des tensioactifs biosourcés, principalement des produits partiellement biosourcés. De plus, la croissance du taux de pénétration des matières premières végétales dans les détergents serait également liée à d'autres produits que les tensioactifs (Tableau I-8).

Les graines de chia et les amandes de *I. gabonensis* intègrent parfaitement cette chimie verte et durable du carbone renouvelable qui contribue à minimiser l'impact environnemental de la production et des biens.

Tableau I-8 : Estimations de tonnages pour les différents segments à horizons 2020 et 2030 (source ADEME)

	2012	2020	2030 (scénario bioéconomie)
Produits simples			
Résines	43	100	250
Solvants	35	55	145
Tensioactifs	120	133	190
Total	198	288	595
Produits formulés			
Détergents	86	94	1290
Cosmétiques	900	1050	170
Total	1468	2006	3817

Les esters de sucre d'acides gras (ESAG) sont des tensioactifs biosourcés présentant un grand intérêt grâce à leurs propriétés valorisables à travers diverses applications dans les industries de nettoyage ménagers (44%), des soins personnels (11%), médicales et pharmaceutiques (8%), nettoyages industriels et institutionnels (7%), alimentaires (6%), agricoles (4%), textiles (2%), autres (18%) (Figure I-10) (5,86).

Du fait de leur caractère non toxique, les esters de sucre sont utilisés dans l'industrie alimentaire en tant qu'agents émulsifiants ou stabilisateurs. Leurs propriétés biologiques et l'innocuité envers la peau et les muqueuses permettent de les utiliser dans les domaines pharmaceutique et médical en tant qu'agents émulsifiants.

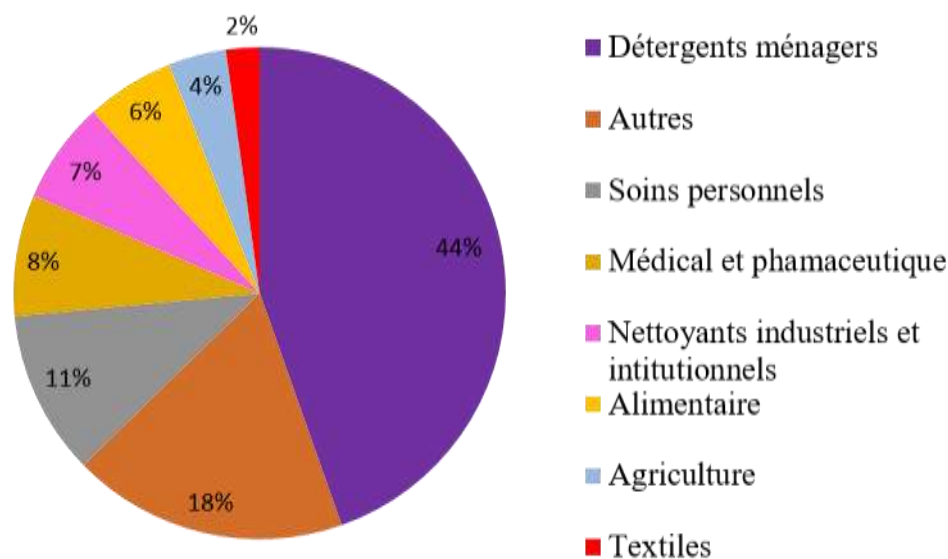


Figure I-10 : Marché global des biotensioactifs par application, 2017-2023

I.4.2. Propriétés et applications

Les esters de sucre d'acides gras présentent diverses propriétés. Celles-ci sont en rapport avec la nature des substrats mais également liées au degré de substitution (DS) du produit obtenu. On entend par degré de substitution (DS) le nombre de groupes hydroxyles estérifiés ou le nombre de groupes acétate remplacés par des acides gras à longue chaîne. Le degré d'estérification (le nombre de groupes hydroxyles estérifiés par des acides gras) est souvent utilisé de manière interchangeable avec le degré de substitution. Les esters de sucre d'acides gras ayant un DS de 1 à 3 sont hydrophiles, digestibles, absorbables, et sont utilisés en solubilisation, mouillage, dispersion, comme agents émulsifiants (spécialement les émulsions H/E) et stabilisants, antimicrobiens et revêtements de protection pour les fruits. Les esters de sucre d'acides gras de DS supérieurs à 4 sont lipophiles, non digestibles et non absorbables.

- **Adsorption aux interfaces et Concentration Micellaire Critique (CMC)**

Les propriétés aux interfaces (liquide-liquide, liquide-solide et liquide-gaz) sont liées au caractère amphiphile des tensioactifs. En solution, la tête hydrophile du tensioactif va s'orienter vers le milieu polaire tandis que la queue lipophile ira vers le milieu le moins polaire. Cette organisation a pour conséquence la diminution de la tension interfaciale entre les deux milieux.

L'adsorption des tensioactifs est responsable de la majorité des propriétés observées par ces molécules :

- Emulsifiants, solubilisants (interface liquide-liquide)
- Mouillants, solubilisants, dispersants, détergents (interface liquide-solide)
- Moussants, détergents (interface liquide-gaz)

La concentration micellaire critique (CMC) est également une propriété importante des tensioactifs. Lorsqu'un tensioactif est dissout dans l'eau, il a tendance à s'adsorber à l'interface liquide-air. A faible concentration, les molécules sont dispersées dans l'eau à l'état libre. L'augmentation de la concentration en tensioactif conduit à la formation de micelles qui sont en équilibre avec les molécules de tensioactif à l'état libre (Figure I-11). Les micelles sont des agrégats moléculaires qui apparaissent à partir d'une certaine concentration en tensioactif : c'est la CMC.

La CMC est déterminée de façon expérimentale par conductimétrie, mesure de la tension de surface.... Les graphes de variation d'une propriété physico-chimique (tension de surface, conductivité par exemple) en fonction de la concentration donnent la valeur de la CMC au changement de pente de la droite. La CMC est dépendante de la longueur de la chaîne hydrophobe, la nature de la tête polaire, la température...

Il faut noter que certains auteurs utilisent le terme concentration d'agrégation critique (CAC). Garofalakis et *al.* ont considéré que pour les solutions tensioactives limpides, la CAC correspond à la CMC. En revanche, pour des solutions tensioactives troubles à la concentration à laquelle on atteint un plateau de tension de surface, le terme CAC est utilisé car, dans ce cas, le processus d'agrégation est réversible (87). Le Tableau I-9 regroupe les tensions de surface et les CMC d'esters de saccharose.

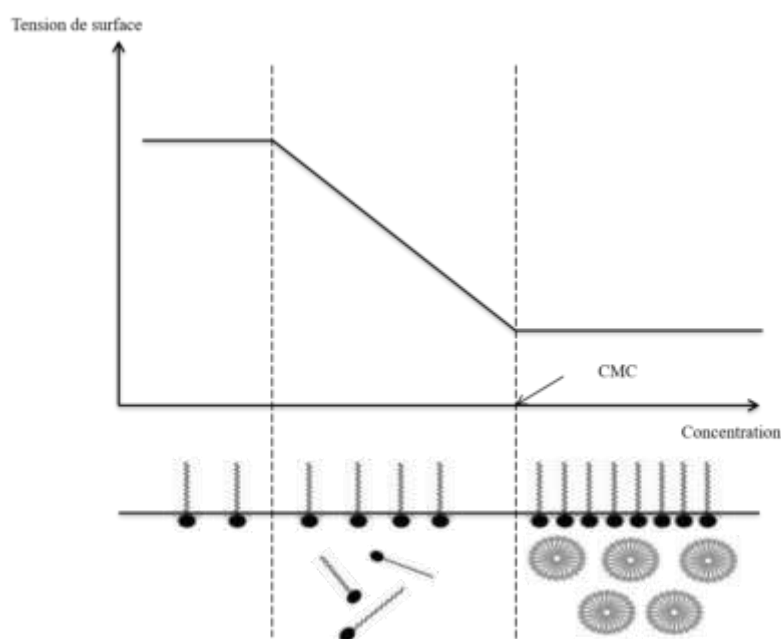


Figure I-11 : Tension de surface en fonction de la concentration en tension de surface

Tableau I-9 : Tension de surface et concentration micellaire critique d'esters de sucre commerciaux

Nom	Tension de surface (mN/m)	CMC (mM)	Références
Laurate de saccharose (L1695)	32,96	0,42	
Palmitate de saccharose (P1670)	34,5	0,01	(88)
Stéarate de saccharose (S1670)	34,7	0,03	(89)
SP30 (30% monoesters, 70% di et polyesters)	44,5	0,06	(89)
SP70 (70% monoesters, 30% di et polyesters)	34,6	0,03	

Sefha et *al.* ont obtenu des esters de sucre dotés d'une tension de surface de 41 mN/m et une CMC de 239 μ M pour le monopalmitate de glucose (90). Olive et *al.* ont rapporté une tension de surface de 32,2mN/m et une CMC de 80 μ M pour le monolaurate de fructose (91). Les propriétés de surface sont variables en fonction des matières premières utilisées. Les tensions de surface (mesurées à la CMC) et les CMC des esters de saccharose commerciaux sont données dans le Tableau I-9. Pour le laurate, palmitate et stéarate de saccharose commercialisés par Ryoto (Mitsubishe-Kasei Food Corporation, Tokyo Japon), les tensions de surface augmentent avec la longueur de la chaîne alkyle. Pour les mélanges d'esters (SP30 et SP70 commercialisés par Sisterna C.V. Roosendaal, Pays-Bas), on remarque que plus le sucre est substitué, plus la tension

de surface est élevée (89). La HLB, la CMC et les tensions de surface des esters de saccharose sont largement décrits dans les études précédentes (88,89,92).

- **Balance Hydrophile/Lipophile ou HLB**

La HLB est une notion empirique introduite par Griffin dans le but de prévoir le domaine d'utilisation d'un tensioactif (93). La HLB d'un tensioactif non ionique peut être déterminée expérimentalement ou par calcul à partir de la structure chimique de la molécule.

La valeur de HLB d'un tensioactif non ionique peut être calculée par la formule suivante :

$$\text{HLB} = (\text{H}/(\text{H}+\text{L})) \times 20$$

H représentant la masse molaire de la partie hydrophile et L, celle de la partie lipophile.

En 1957, Davies a suggéré une échelle permettant de déterminer la valeur de HLB pour n'importe quelle molécule. La méthode basée sur la structure des molécules tensioactives prend en compte le pourcentage en poids de chacun des groupes hydrophiles et/ou lipophiles. La valeur est calculée comme suit :

$$\text{HLB} = 7 + \sum \text{HLB (groupes hydrophiles)} - \sum \text{HLB (groupes hydrophobes)}$$

Il faut noter que l'échelle de Davies est obtenue à partir de la formule de Griffin qui donne les valeurs de HLB uniquement pour les molécules non ioniques.

La formule de calcul pour la HLB des polyols estérifiés par les acides gras est :

$$\text{HLB} = ((1-\text{S})/\text{A}) \times 20$$

Où S est l'indice de saponification et A l'indice d'acide de l'acide gras.

Griffin a établi une relation entre la valeur de la HLB d'un tensioactif et ses applications. L'échelle de Griffin, dont les valeurs sont comprises entre 1 et 20, permet d'apprécier le caractère plutôt lipophile ou au contraire hydrophile d'un amphiphile et de savoir pour quelle application il est le mieux adapté (Tableau I-10).

Tableau I-10: Applications des tensioactifs en fonction de la valeur de la HLB

HLB	Propriétés
1,5-3	Anti-moussants
3-6	Emulsifiants eau dans huile
7-9	Moussants
8-13	Emulsifiants huile dans eau
13-15	Détergents
15-20	Solubilisants

La valeur de la HLB dépend de la longueur de la chaîne et du degré de substitution du sucre. Liang et *al.* ont montré que les propriétés du 6-O-acylglucose (chaînes alkyles de 6 à 18 atomes de carbones) sont dépendantes de la chaîne alkyle. En effet, l'étude des propriétés moussantes et émulsifiantes a montré que lorsque la longueur de la chaîne latérale alkyle augmente, les valeurs de la HLB diminuent de 9 (C6) à 5,7 (C18) tandis que les stabilités des émulsions s'améliorent. Pour avoir de bonnes propriétés moussantes, les chaînes latérales alkyles de 9 à 11 atomes de carbone au moins sont nécessaires (94).

- **Propriétés thermiques (95)**

Il est important d'étudier les propriétés thermiques des esters de sucre afin d'évaluer leur applicabilité dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. Les esters de sucre ont des points de fusion compris entre 40 et 79°C selon leur degré de substitution. Ils peuvent être utilisés pour la préparation de suspensions solides par fusion (95).

- **Propriétés biologiques**

Les ESAG présentent une faible toxicité et une biodégradabilité élevées (96,97), ils sont non irritants pour la peau (98). A faible concentration (10µg/mL), le myristate de mannose apparaît comme non toxique pour les cellules de mammifères. Il a également révélé des activités antibactériennes avec des valeurs de IC₅₀ de 16-32 µg/mL et 128 µg/mL contre *S. aureus* et *E. coli* respectivement (99). Le 6-O-laurate de saccharose et le 6'-O-laurate de maltose inhibent la croissance de *Bacillus sp.* à une concentration de 0,8 mg/ml et de *Lactobacillus plantarum* à 4 mg/mL. Par contre, le dilaurate de saccharose et le 6-O-laurate de glucose n'ont pas révélé d'activité antimicrobienne probablement dû à leur faible solubilité dans l'eau (100). Les diesters

de tréhalose d'acides gras (C8 à C14) ont révélé des activités antitumorales à des concentrations comprises entre 2,6 et 23 μM (101).

L'octanoate de saccharose riche en monoesters a révélé une activité insecticide à des concentrations de 1,2 à 2,4 mg/mL (102) ainsi que des effets contre les microorganismes responsables du développement des caries à 100 $\mu\text{g/mL}$ pour 6-O-laurate de saccharose, 6'-O-laurate de maltose et 6''-O-laurate de maltotriose (103).

Des études antérieures ont fait état des voies de synthèse, des propriétés et des applications potentielles de ces composés pour des applications dans les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (92,104,105). La synthèse se concentre sur les esters ayant un DS de 1-3 qui ont un certain nombre de propriétés intéressantes : HLB , CMC, tension de surface, stabilité émulsifiante (en particulier les émulsions H/E et certaines émulsions E/H, les émulsions multiples), capacité de moussage (94,106), activités biologiques et propriétés thermiques.

Les esters de saccharose sont les plus largement utilisés ; ceux dont le DS est de 1 à 4 sont hydrophiles, tandis que ceux dont le DS est de 5 à 8 sont lipophiles. Les esters de saccharose ayant une faible DS ont une valeur de HLB d'environ 5-16 et sont les plus adaptés à une utilisation dans des émulsions H/E. Les esters de saccharose hydrophiles sont digestibles et absorbables (DS 1-3), antimicrobiens (DS 1-2) et peuvent être utilisés comme émulsifiants, agents mouillants ou dispersants, agents de solubilisation et de stabilisation (92,95). Il a été démontré que certains ESAG ont des activités insecticides et antitumorales (88,99–102,107). Ces composés sont stables à des températures allant jusqu'à 120-130°C, la décomposition totale se produisant généralement à 260°C.

I.5. Voies d'obtention des esters de sucre d'acides gras

Les ESAG sont généralement obtenus via trois grands types de réactions : l'estérification directe à partir d'un acide gras, l'estérification indirecte à partir de chlorures d'acides gras et la transestérification à partir d'un ester (méthylique, glycérique, vinylique). Les acides gras et les esters méthyliques et glycériques sont généralement moins réactifs que les chlorures d'acides gras et les esters vinyliques. De même, les fonctions hydroxyles du sucre sont peu réactives. Le saccharose, le glucose et le sorbitol sont les matières premières de départ préférées car disponibles en grandes quantités à des prix attractifs.

Les matières premières mises en jeu pour l'obtention des ESAG étant peu réactives, les réactions sont généralement réalisées par catalyse chimique ou catalyse enzymatique afin d'abaisser

l'énergie d'activation. L'immiscibilité et l'hétérogénéité des réactifs nécessitent de choisir un milieu réactionnel permettant de faciliter leur mise en contact. Les milieux réactionnels possibles sont :

- Milieu solvant organique ;
- Milieu savons d'acides gras ;
- Milieu aqueux ;
- Milieu émulsion/microémulsion ;
- Milieu fondu.

L'obtention des ESAG peut s'avérer difficile dans le cadre notamment du contrôle du degré de substitution aussi bien en synthèse chimique qu'enzymatique. La synthèse par voie enzymatique présente l'avantage de réaliser des réactions régiosélectives et conduit généralement à l'obtention d'esters de sucre de faible degré de substitution. Cependant, cette dernière requiert des temps de réactions longs et l'utilisation de solvants organiques capables de dissoudre les réactifs sans désactiver l'enzyme. En catalyse chimique, les réactions sont généralement non régiosélectives et conduisent à un degré de substitution non contrôlé. De plus, les synthèses par voie chimique posent souvent les problèmes de toxicité des solvants utilisés, de l'augmentation de la viscosité du milieu au cours de la réaction, de la dégradation (caramélisation) du sucre utilisé et des difficultés de purification des produits obtenus. Face à toutes ces contraintes, la recherche de nouveaux procédés de production, pour la synthèse des ESAG, adaptés aux normes actuelles en termes de préservation de l'environnement et proposant de faibles coûts de production est en cours de développement.

I.5.1. Synthèse par voie enzymatique des esters de sucre

Plusieurs auteurs s'accordent à dire que la synthèse enzymatique des esters de sucre constitue une voie intéressante pour l'obtention de ces composés à cause du caractère régiosélectif des réactions d'acylation des sucres et donc du contrôle du DS. Plusieurs paramètres permettent de contrôler le degré d'estérification des esters de sucre par voie enzymatique : la spécificité de l'enzyme, des substrats, du solvant organique, et les conditions de réactions (mode d'agitation, température, pH, temps de réaction, rapport molaire entre les substrats) (108–118). Dans la majorité de ces synthèses, des tamis moléculaires sont utilisés afin d'assurer le piégeage de l'eau au cours des réactions d'estérification directes.

La synthèse enzymatique des ESAG est généralement réalisée par estérification entre un sucre et un acide gras ou par transestérification d'un sucre et un ester d'acide gras ou des esters vinyliques en présence ou en l'absence de solvant et à basse température pendant des temps relativement longs. Les enzymes utilisées sont généralement des lipases (112) ou des protéases alcalines (119). La régiosélectivité des réactions enzymatiques est essentiellement due à l'activité des enzymes. Ces dernières permettent d'obtenir généralement des sucres monoacylés et à quelques exceptions, des sucres diacylés. L'enzyme peut être utilisée sous forme immobilisée afin de la stabiliser et la rendre réutilisable (90).

L'efficacité d'une enzyme au cours de la synthèse des ESAG va dépendre des caractéristiques des substrats. Pour le donneur d'acyle, la sélectivité et la réactivité avec l'enzyme vont dépendre de la longueur de la chaîne, des effets stériques des insaturations (120). Selon la littérature, le fructose, le saccharose et le glucose sont préférables en tant qu'accepteur d'acyle dans les réactions enzymatiques comparés à d'autres sucres comme le xylose ou le maltose (111,121). Cette observation peut s'expliquer par les travaux réalisés par Ye et *al.* (2012) (122) qui ont montré que la réactivité de l'accepteur d'acyle va dépendre de la taille de ses particules en suspension. Les travaux rapportent que la taille des particules de xylose (1 675 μm) est supérieure à celle du glucose (904 μm), du saccharose (707 μm) et du fructose (690 μm). La taille des cristaux du sucre va influencer le rendement de synthèse de la réaction. Le rendement le plus élevé est obtenu pour le fructose (91%) tandis que le rendement le plus faible est obtenu à partir du xylose (73%) (122). Ye et *al.* (2014) (118) ont étudié l'effet de la taille des particules de saccharose en suspension sur la synthèse de l'oléate de saccharose. Ils ont démontré que la combinaison des ultrasons à haute intensité avec une homogénéisation à haute vitesse permet de réduire la taille des particules de 88 à 18 μm après 1 h de traitement. Ainsi, la méthode d'agitation est également un facteur clé pour la synthèse des ESAG en catalyse enzymatique. La synthèse enzymatique du palmitate de saccharose et d'autres sucres réalisée par Du et Luo à l'aide d'un microréacteur à écoulement permet d'obtenir des esters monoacylés à plus de 80% en seulement 30 min et à une température de 50°C là où l'agitation classique nécessite 24 h de réaction pour atteindre de bons rendements de synthèse (123).

Un autre défi majeur dans l'obtention des ESAG est de trouver le solvant adéquat pour solubiliser les réactifs qui ont des polarités différentes sans désactiver l'enzyme. En synthèse enzymatique, les solvants généralement utilisés pour dissoudre les sucres et les corps gras sont des solvants polaires tels que le DMSO, le DMF, la pyridine, etc. Ces derniers conduisent parfois à la désactivation de l'enzyme et sont incompatibles pour des applications alimentaires des produits

obtenus (119). Reyes-Duarte et *al.* ont étudié l'effet de plusieurs paramètres dans la synthèse enzymatique du palmitate de saccharose. Ils ont démontré que l'utilisation du DMSO avec un alcool tertiaire améliore la solubilité du sucre et réduit l'inactivation de l'enzyme comparé à l'utilisation du DMSO pur (124).

Certains solvants organiques ont été utilisés comme adjuvants pour les réactions en catalyse enzymatique (2-méthyl-2-butanol, t-butanol, acétone, méthyl éthyl cétone). De faibles volumes de ces solvants suffisent pour créer une petite phase catalytique dans laquelle l'enzyme est activée, permettant ainsi d'obtenir des ESAG avec de bons rendements (125,126). Les réactions d'estérification ont également été réalisées sans l'utilisation de solvant (127,128).

Méline T. et *al.*, ont réalisé la synthèse enzymatique du laurate de xylose et du laurate d'arabinose en présence d'une lipase B (Novozym 435). Les conditions optimums de la réaction sont présentées dans le tableau 3. Les résultats obtenus révèlent le caractère régiosélectif de la réaction d'acylation sur les hydroxyles primaires. La seconde acylation serait également sélective en position O-3 pour l'arabinose, en position O-2 et O-3 pour le xylose. Les composés obtenus ont montré de bonnes propriétés interfaciales pour les composés purs ou mélangés. La mesure de la tension interfaciale air/eau est réalisée en solubilisant les esters purifiés dans le DMSO et injectés dans une sous phase constituée d'une solution tampon Tris HCl de pH 7 dans la gamme de concentration finale. L'injection est réalisée de sorte à ne pas troubler l'interface air/eau. Les monoesters purs d'arabinose et de xylose ont révélé une CAC de 8,4 et 11,5 μM respectivement. Pour un mélange constitué de mono et diesters, la CAC était de 11,8 μM dans le cas de l'arabinose et de 23,4 μM dans celui du xylose. Pour ces quatre cas, les tensions interfaciales étaient comprises entre 8 et 16 mN/m. Par contre, pour les diesters purs d'arabinose et de xylose, la mesure de la tension interfaciale n'a pas pu être réalisée car les produits présentaient un caractère hydrophobe élevé à faible concentration (114). Ces résultats révèlent l'importance de contrôler de degré de substitution au cours d'une synthèse car ce paramètre influence les propriétés de surface des esters formés et donc leurs applications.

Duarte-Reyes et *al.* ont étudié la synthèse du palmitate de saccharose monoacylé dans un mélange de solvants : le DMSO et le 2-méthylbutan-2-ol. Dans cette étude, deux protocoles de synthèse ont été réalisés. Les résultats montrent que l'ordre de dissolution des réactifs, les concentrations et quantités des solvants ainsi que la nature du donneur d'acyle ont une influence sur le rendement de la synthèse (124). Le Tableau I-11 regroupe quelques exemples de synthèse des ESAG obtenus par voie enzymatique.

I.5.2. Les esters d'oligo et polysaccharides

Van den Broek et Boeriu ont étudié la transestérification enzymatique de la pectine de pomme (méthylée à 75%) avec le laurate de vinyle dans du CO₂ supercritique. L'enzyme utilisée était la lipase Novozyme 435 de *C. antarctica*. Les conditions de réaction étaient 300 bars, incubation à 100°C pendant 96 h d'une part et 80°C pendant 116 h d'autre part. Les tamis moléculaires sont utilisés pour retirer l'eau tout au long de la réaction. Après libération du CO₂ et lavage à l'hexane de la poudre obtenue, le produit est analysé par spectroscopie Infrarouge. Les spectres IR ont présenté une absorbance à 1720 cm⁻¹, caractéristique de la présence du groupe ester formé.

La pectine de betterave a également été estérifiée avec du laurate de vinyle dans du *ter*-butanol. La réaction a été réalisée avec une lipase Novozyme 435 de *C. antarctica* à 60°C pendant 72 h. La détermination du degré de substitution par une calibration IR montre qu'en utilisant le *ter*-butanol, les produits obtenus ont un DS d'environ 0,29 et 0,14 lorsque la réaction est réalisée dans du CO₂ supercritique (129).

Tableau I-11 : Exemples d'esters de sucres produits par voie enzymatique

Sucre	Donneur d'acyle	Réaction	Enzyme	Solvant et co-solvant	Température (°C)	Temps (h)	Conversion (%)	DS	Références
Glucose Maltose Maltriose	Acides gras C4 à C20	Estérification	Novozyme 435 de <i>Candida antarctica</i>	<i>ter</i> -butanol anhydre	45	24		1	(111)
Glucose	Acide palmitique	Estérification	Lipozyme IM de <i>Mucor miehei</i> Palatase M de <i>Rhizomucor miehei</i>	Hexane Acétone	40	103	41 54	1	(130)
Saccharose Glucose Maltose	Esters vinyliques en C12 et C16	Transestérification	Novozyme 435 de <i>Candida antarctica</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i> /DMSO (4 : 1)	40	20	99 25	1 à 2	(100)

Saccharose	Acide palmitique Palmitate de vinyle Palmitate de méthyle Palmitate d'éthyle	Estérification Transestérification	Novozym 435 Lipase immobilisée de <i>Candida antarctica</i>	2-méthyl-2-butanol /DMSO (4 : 1)	60	120	1,6-21,5	1 à 2	(124)
Saccharose Glucose Mannose Galactose Maltose Fructose	Esters vinyliques en C12 et C16	Transestérification	Lipozyme TL IM de <i>Thermomyces laguginous</i>	2-méthyl-2-butanol /DMSO (4 : 1)	52	0,5	35-95	1	(123)
Fructose	Acide laurique	Estérification	Novozyme 435, lipase de <i>Candida antarctica</i>	2-méthyl-2-butanol	60	48	78	1 ≤	(91)
Glucose	Acides gras en C6, C12 et C16	Estérification	Lipase immobilisée de <i>Candida antarctica</i>	2-méthyl-2-butanol /DMSO (1 : 4)	55	48	90	1	(117)

Arabinose	Acide palmitique		Estérification	Novozyme 435, lipase B <i>Candida antarctica</i>	DMSO dans le <i>ter</i> -butanol	60	24	7-21	1	(131)
Xylose Arabinose	Laurate de vinyle	de	Transestérification	Novozyme 435, lipase <i>Candida antarctica</i>	2-méthyl-2-butanol	50	4	75	1 à 2	(114)
Glucose	Esters vinyliques en C6 à C18		Transestérification	Novozyme 435	THF/Pyridine (4 : 1)	40	48	29-95	1	(94)

I.5.3. Synthèse en milieux atypiques

Parmi les problèmes majeurs que pose la synthèse organique, on retrouve l'utilisation des solvants organiques souvent toxiques. L'évolution de la recherche dans ce domaine a conduit à la découverte de nouveaux solvants tels que les liquides ioniques et les solvants eutectiques profonds (Deep Eutectic Solvent DES). L'attention portée sur ces solvants est croissante, depuis les 20 dernières années pour les liquides ioniques et plus récemment pour les DES (132–137). La Figure I-12 présente le nombre de publications répertoriées sur les liquides ioniques et les DES utilisés comme solvant selon Web of Science.

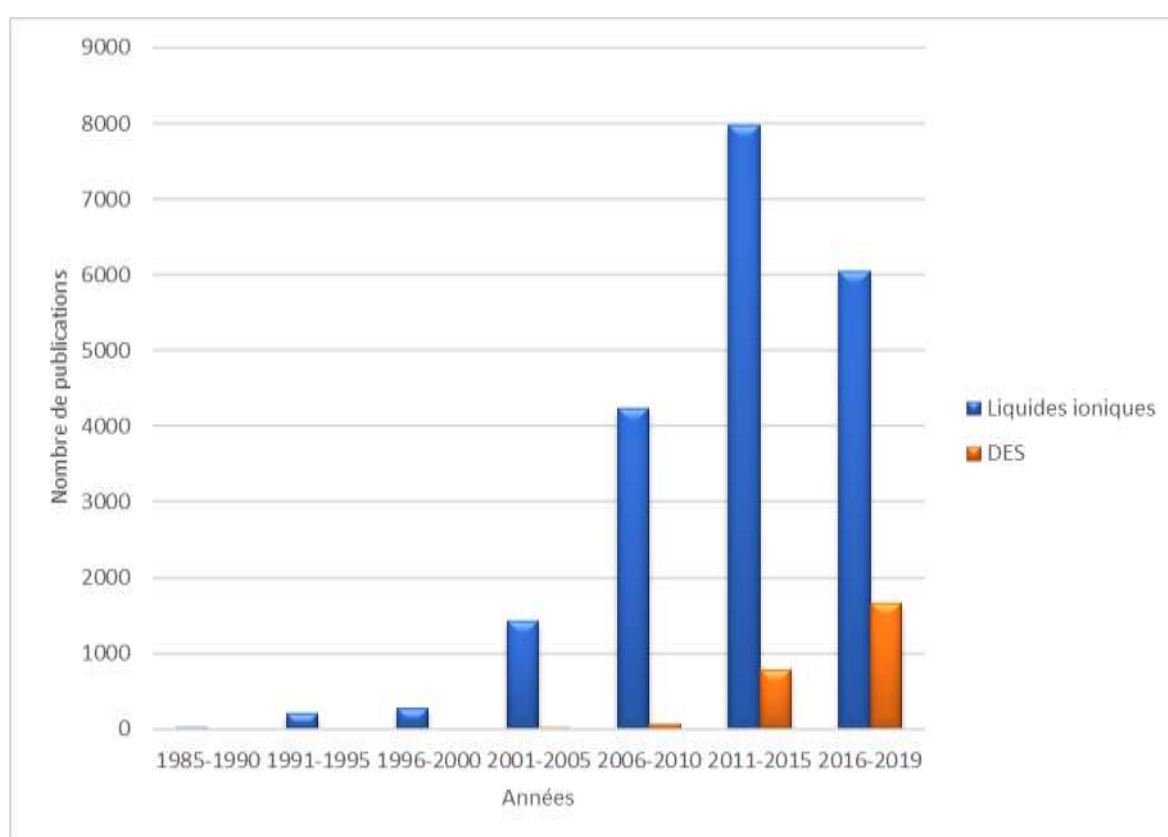


Figure I-12 : Evolution du nombre de publications sur les liquides ioniques et DES utilisés comme solvants (référence : Web of Science).

a. Synthèse en milieu liquides ioniques

Les liquides ioniques ont été utilisés pour la synthèse des ESAG afin de remplacer les solvants classiques et pallier le problème de l'immiscibilité du sucre avec le corps gras. Les liquides ioniques sont des sels organiques qui fondent en dessous de 100°C. Ils peuvent être utilisés pour dissoudre des composés organiques polaires et non-polaires, inorganiques et des composés polymériques. Ils sont utilisés dans la synthèse des ESAG car ils sont peu volatils, présentent

une bonne stabilité chimique et thermique, et possèdent un pouvoir solubilisant. Les réactions sont généralement réalisées en présence d'enzymes (138–140).

Lin *et al.* ont décrit la synthèse du laurate de glucose en milieu liquides ioniques (141,142). Le tétraalkylammonium l'acétate et le 2-méthylbutan-2-ol ont été utilisé comme solvant de la réaction. L'utilisation de ce système bi-solvant présente plusieurs avantages : le double rôle de catalyseur et de solvant, la réaction régiosélective se déroulant dans des conditions douces sans la nécessité de supprimer l'eau tout au long de la réaction. Cependant, les produits obtenus en présence des liquides ioniques sont difficiles à récupérer. Un mécanisme de synthèse a été proposé pour cette réaction : en présence d'eau, il y a mise en solution des ions tétraalkylammonium (tétrabutyle, tetraéthyle et tétraméthyle) et acétates. Ces derniers vont attaquer par substitution nucléophile l'oxygène en position 6 du glucose. Le doublet non liant de l'oxygène du glucose attaque le carbonyle du laurate de vinyle (Figure I-13).

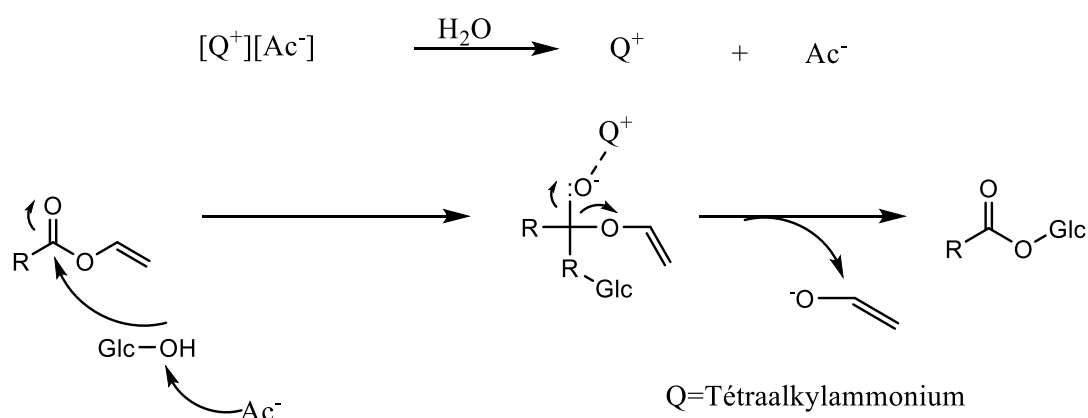


Figure I-13 : Exemple de mécanisme de synthèse des ESAG dans un liquide ionique (143)

b. Synthèse avec les DES

Les DES (Deep Eutectic Solvent) ou solvants eutectiques profonds sont un nouveau type de solvants adoptés récemment par la communauté scientifique. Les DES résultent de la complexation entre un sel d'ammonium quaternaire ou un accepteur d'hydrogène et un donneur de liaison hydrogène (HBD). Ce mélange conduit à une substance dont le point de fusion est inférieur aux points de fusion de chaque composé pris individuellement (Figure I-14). Lorsque les composés permettant de préparer les DES sont des métabolites primaires, tels que des aminoacides, les acides organiques, les sucres ou les dérivés de la choline, les DES obtenus

sont appelés solvants naturels eutectiques profonds (Natural Deep Eutectic Solvents NADES) (144).

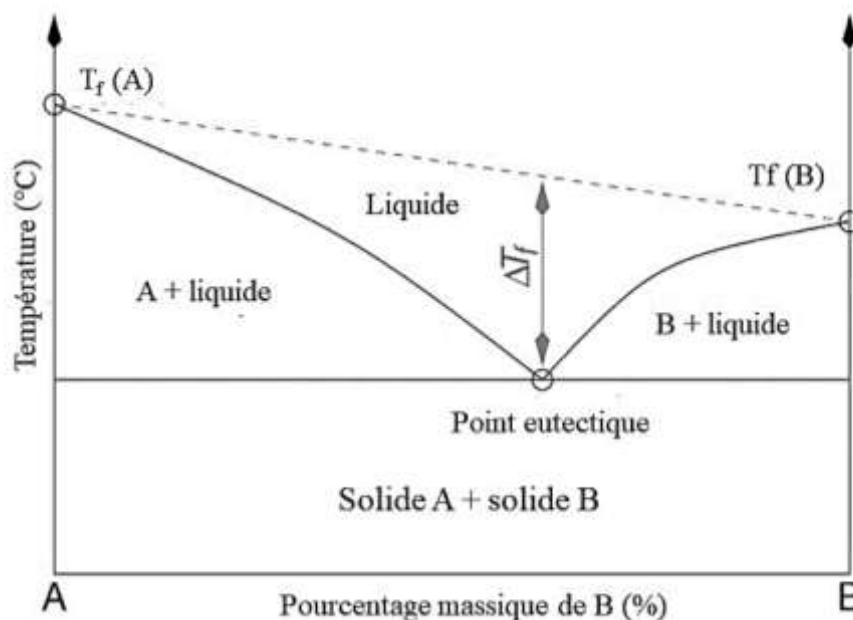


Figure I-14 : Représentation schématisée d'un diagramme de phase avec eutectique (135)

Les DES se distinguent des liquides ioniques par le processus chimique de formation et la source des matières premières. Les DES sont plus faciles à préparer et sont obtenus à partir de composés disponibles et moins coûteux. De plus, ils sont reconnus comme des composés biodégradables, biocompatibles et durables comparés aux liquides ioniques. Ils représentent donc une alternative aux liquides ioniques dont le caractère vert est souvent remis en question à cause de leur faible biodégradabilité, biocompatibilité et durabilité.

L'un des problèmes généralement rencontrés lorsqu'on utilise un DES comme solvant est la viscosité élevée du milieu. L'étude de leur propriétés physiques et thermiques (densité, viscosité, polarité, conductivité et température) est importante afin d'adapter la préparation du DES aux applications recherchées (135,137,145).

Hayyan et *al.*, ont étudié les propriétés physiques d'un DES constitué de chlorure de choline (ChCl) et de glucose (Glc). Les résultats obtenus montrent que pour les ratios ChCl:Glc de 1:1, 1.5:1, 2:1 et 2.5:1 en poids, le DES est liquide et incolore à température ambiante. Dans les cas inverses (ratios ChCl:Glc 1:1.5, 1:2 et 1:2.5), le mélange est semi-solide. La raison probable de

cette observation est que la quantité de choline n'est pas suffisante pour créer une liaison hydrogène avec le glucose disponible. Il y a donc saturation en glucose. Les DES sont très sensibles à la température. Pour le mélange ChCl:Glc, dans un ratio 1/1, la viscosité est de 209,3 mPa.s et une densité de 1,2659 g.cm⁻³. Pour un ratio 2/1, la viscosité est de 72,0 mPa.s et une densité de 1,2115 g.cm⁻³. Leur pH est neutre et peu sensible à la chaleur (146). Ces propriétés peuvent être des inconvénients pour la synthèse des esters de sucres (147).

Pöhnlein et *al.* ont étudié la synthèse de l'hexanoate de glucose par voie enzymatique à partir de différents DES (148). Les DES sont préparés en mélangeant les sels d'ammonium (bétaine ou chlorure de choline) et le donneur d'hydrogène (urée, glycérol, éthylène de glycol ou glucose) dans différentes proportions à 100°C jusqu'à ce que le mélange soit liquide. Les différents réactifs (glucose : 1,38 mmol et hexanoate de vinyle : 2,72 mmol) sont dissous dans 3,5 mL de DES. L'enzyme est ajoutée et la réaction est mise à incubation pendant trois jours à 70°C (Figure I-15). Les DES présentent l'intérêt d'être de bons solvants pour les deux substrats. Dans le cas du DES constitué de la choline et du glucose, l'addition supplémentaire de sucre n'est pas nécessaire car le DES joue simultanément les rôles de substrat et de solvant. Les résultats montrent que le produit obtenu est le 6-O-hexanoate de glucose de DS 1.

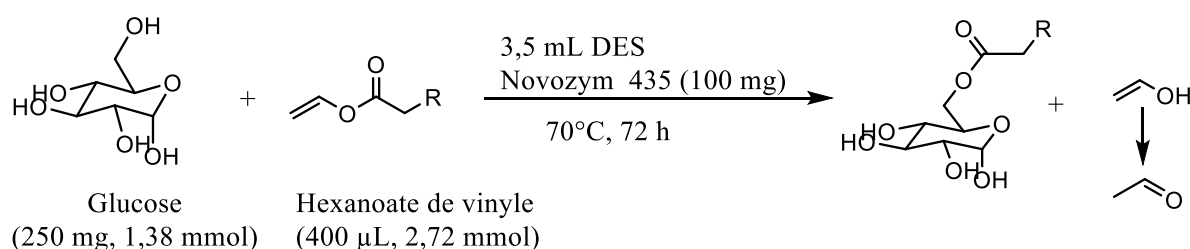


Figure I-15 : Synthèse de l'hexanoate de glucose en présence de DES (148)

L'utilisation des NADES a également été évoquée pour solubiliser les composés non solubles ou faiblement solubles dans l'eau ainsi que les macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides (136). Lores et *al.* ont étudié la solubilisation du gluten dans différents DES. Pour faciliter la solubilisation et diminuer la viscosité du gluten, l'eau a été ajoutée comme un autre composant du DES et les ultrasons ont également été utilisés (149).

La préparation des DES peut se faire à partir de plusieurs substrats glycosylés que l'on retrouve dans la nature. Ainsi, on retrouve des DES dont la combinaison concerne au moins deux composants. D'autre part, on note également l'utilisation d'acides tels que les acides lactique, malique, citrique dans la préparation des DES. Dai et *al.*, rapportent une liste de DES obtenus

à partir de deux ou trois composants et de différents types de substrats. On retrouve ainsi des DES obtenus à partir de fructose, glucose, sorbitol, mannitol, lactose, saccharose, etc (137,144,150).

I.5.4. Utilisation de la cavitation ultrasonore et des micro-ondes

Depuis quelques années, de nouvelles techniques de synthèse des esters de sucre ont été proposées et initiées afin de surmonter les problèmes que posent ces synthèses et d'augmenter les rendements de synthèse. En plus de la quête de nouveaux solvants, le mode d'activation par cisaillement est un paramètre important pour favoriser la miscibilité des réactifs. Les ultrasons ont ainsi été étudiés dans le cadre de la synthèse des esters de sucre d'acides gras.

Xiao et *al.* ont réalisé la transestérification du glucose avec trois dicarboxylates de divinyle de longueur de chaînes différentes (C4, C6, C10) comme donneur d'acyle dans un solvant non aqueux (pyridine, DMF,...) en présence d'enzymes (protéase de *B. subtilis*, lipase Novozyme 435 de *C. antarctica*, ...) (Figure I-16). La réaction est réalisée dans un bain à ultrasons à 50°C. Les résultats montrent que les ultrasons permettent d'accélérer la réaction de synthèse sans changer le caractère et la régiosélectivité de l'enzyme. Les produits obtenus sont les monoesters 6-O-vinylbutanedioyl-D-Glucose, 6-O vinylhexanedioyl-D-Glucose, 6-O-vinyldecanedioyl-D-Glucose de DS 1 (151).

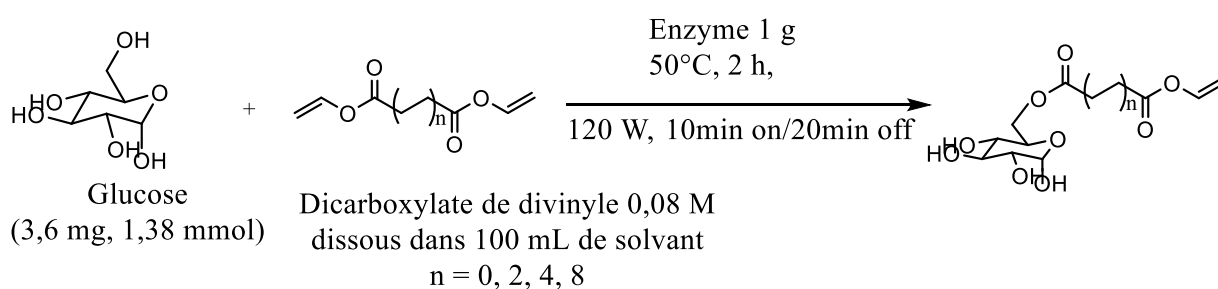


Figure I-16 : Synthèse enzymatique des esters de sucre par cavitation US

Huang et *al.* ont réalisé la synthèse des esters de saccharose par cavitation ultrasonore en présence d'un catalyseur basique. Ils ont montré que l'utilisation des ultrasons accélère la réaction de transestérification entre le saccharose et les esters éthyliques d'acide gras (C8, C12, C14 et C16). Les conditions optimum de la réaction étaient : ratio molaire saccharose/ ester d'éthyle de 2:1, K₂CO₃ (13% de l'ester éthylique) comme catalyseur, DMSO comme solvant.

La réaction s'est déroulée à 70°C pendant 2 h sous une pression de 11 kPa. La synthèse a conduit à un rendement de synthèse supérieur à 73% d'ester de sucre dont 92 à 95% représentaient des monoesters de saccharose et d'acide gras aliphatique (152).

Prabhakar et *al.* ont réalisé la synthèse aux micro-ondes des esters de tréhalose. La réaction a été réalisée dans du t-BuOH en faisant réagir le tréhalose en présence du donneur d'acyle et d'une lipase (CAL-B immobilisé). Le mélange a été placé sous atmosphère d'azote et en présence de tamis moléculaires puis dans un four à micro-ondes à 180 W et 51°C pendant 1 h. Les produits obtenus sont des monoesters de tréhalose ou des diesters en fonction de la quantité du donneur d'acyle introduite (153).

I.5.5. Les esters de sucre obtenus par voie chimique

Plusieurs travaux et brevets sur la synthèse des esters de saccharose utilisant la voie chimique ont été déposés ces dernières années. Les méthodes décrites pouvant, dans certains cas, être appliquées à un spectre large de sucres (mono-, di-, oligo- et polysaccharides).

a. Réaction en milieu solvant

La synthèse des ESAG par catalyse chimique la plus répandue est celle réalisée en milieu solvant organique. Les solvants organiques généralement utilisés sont le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diméthylformamide (DMF), la pyridine, etc, (154–156). Ces solvants présentent l'avantage de faciliter la solubilisation du sucre et de l'acide gras ou des esters (méthylique, triglycéride...).

Cruces et *al.* ont réalisé la synthèse des esters de saccharose en utilisant des esters vinyliques comme donneurs d'acyle. La réaction est réalisée dans le DMSO en présence d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) anhydre comme catalyseur. Ce travail a permis de réaliser la synthèse d'esters de saccharose en évitant des conditions drastiques, de travailler à pression atmosphérique et à faible température. Dans les conditions optimales de la réaction (tableau 5), le DS obtenu est égal à 1 (157).

Wang a réalisé la synthèse de monoesters de saccharose à partir des esters vinyliques d'acide gras utilisés comme donneurs d'acyle et le DMSO comme solvant. L'objectif de ce travail était d'obtenir un rendement élevé en monoesters. De façon générale, la réaction est décrite selon le schéma réactionnel ci-dessous (Figure I-17) :

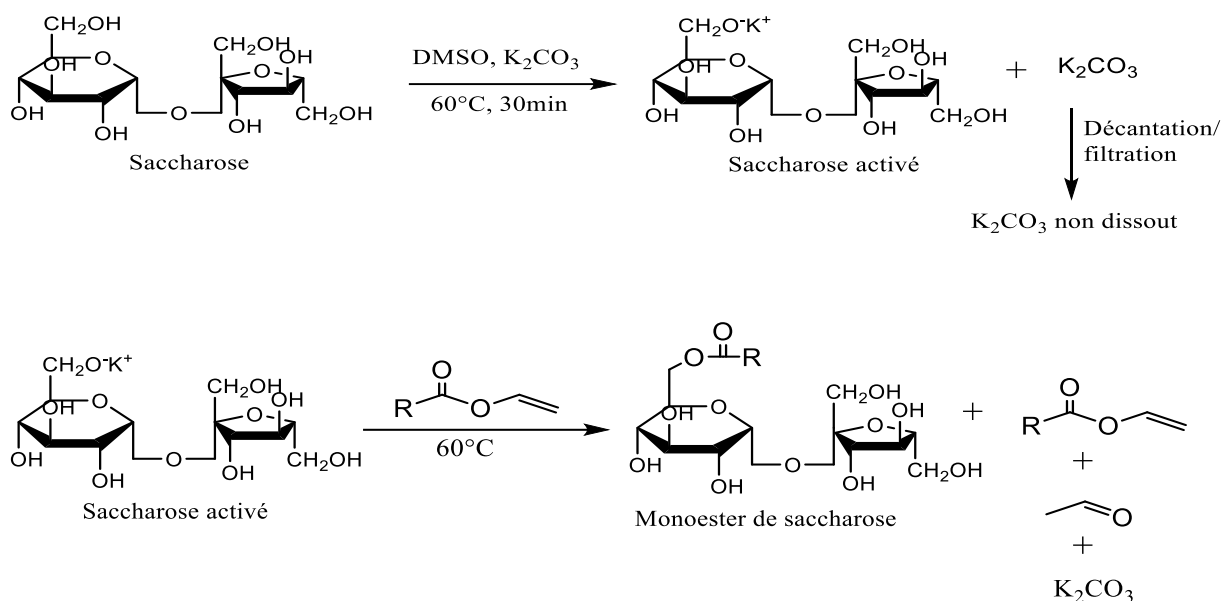


Figure I-17 : Estérification en présence DMSO (156)

Le saccharose est premièrement dissous dans le DMSO à une concentration d'environ 400 mM en présence du K_2CO_3 (1,5 g/L) pour limiter la coloration. Le catalyseur non dissout est enlevé par décantation ou filtration. L'ester vinylique d'acides gras est par la suite ajouté au mélange de façon à former une concentration finale de 100 mM. La réaction est considérée comme totale lorsque la quantité d'ester vinylique d'acides gras ne dépasse pas 10 % en poids de la masse de départ. La teneur en monoesters, mesurée en pourcentage de la teneur totale en esters, après la réaction, est d'environ 90 % et le rendement de réaction calculé sur la base de l'ester vinylique est d'environ 90%. La réaction conduit à la formation de monoesters d'acides gras (156).

AlFindee et *al.* ont réalisé la synthèse des esters de sucre pouvant présenter des activités antibactériennes et antifongiques. L'acylation des sucres a été réalisée par des chlorures d'acyle en présence de la N,N-diméthylaminopyridine (DMAP) et de pyridine utilisés respectivement comme catalyseur et solvant. En fonction de la quantité de chlorures d'acyle utilisée et de la température de réaction, ils ont pu obtenir majoritairement, selon les cas, des esters de sucre mono et diacylés (99).

Ces réactions permettent d'obtenir des esters de sucre de faible DS. Cependant, leur utilisation pourrait être limitée dans certaines applications à cause des esters vinyliques et chlorures d'acyle qui sont d'origine pétrochimique.

b. Réaction en milieu savons d'acides gras

En vue de pallier l'utilisation de solvants organiques toxiques et/ou inflammables et difficiles à éliminer du milieu réactionnel, la synthèse chimique des esters de sucre en milieu sans solvant a été étudiée. La réaction peut être réalisée en présence de sels d'acides gras. Ces derniers vont servir de réactif acylant, de solubilisant et de catalyseur. Ils permettent la mise en contact des réactifs de façon efficace et améliorent les rendements de synthèse. Pour cela, la taille des particules dispersées est un paramètre important.

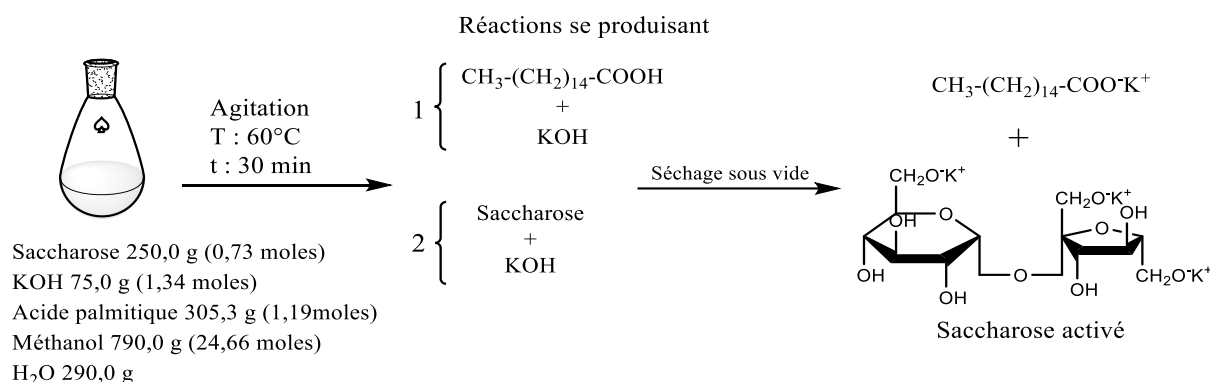
Nagai *et al.* ont réalisé la synthèse d'esters de saccharose de haute qualité, de faible degré de substitution (compris entre 1 et 2), et pouvant être utilisés comme agents émulsifiants. L'invention vise à résoudre les problèmes de viscosité élevée et l'élimination difficile du solvant dans le processus de synthèse des esters de saccharose. Ils ont montré que lorsqu'un solvant ayant des propriétés spécifiques et un saccharose activé sont utilisés dans la réaction de transestérification du saccharose avec un ester de saccharose, des esters de faible degré de substitution de bonne qualité peuvent être produits. Les paramètres clés de la synthèse sont donc le choix du solvant et l'activation préalable du saccharose. La méthyl éthyl cétone est utilisée comme solvant de la réaction dans le but de réduire la viscosité du mélange réactionnel.

L'activation du sucre consiste à obtenir du saccharose dans lequel au moins une partie des protons des groupes hydroxyles est liée à un métal (alcalin ou alcalino-terreux). L'activation du saccharose se fait en dissolvant le sucre et l'acide gras dans une solution aqueuse alcoolique (méthanol, éthanol ou autre) en présence de KOH anhydre. Ce dernier réagit d'une part avec l'acide gras pour former le sel de potassium d'acides gras et d'autre part avec le sucre pour donner le saccharose activé. Le séchage du mélange obtenu est réalisé sous vide avec un évaporateur à 60°C afin d'éviter la décomposition du saccharose. Au cours de ce séchage, le méthanol et l'eau sont éliminés. La poudre blanche obtenue contenant le saccharose activé et le palmitate de potassium est pulvérisée avec un mortier.

L'étape suivante est la réaction de transestérification entre le saccharose activé et le sel d'acide gras en présence des esters de saccharose d'acides gras de degré de substitution varié (DS compris entre 1,5 et 5) utilisés comme agents émulsifiants et la méthyl éthyl cétone comme solvant (Figure I-18). La quantité de saccharose activé utilisée dans la réaction de transestérification est déterminée de sorte que le degré de substitution de l'ester de saccharose soit abaissé à une valeur souhaitée. Une faible température (90°C) est préférable afin d'éviter la décomposition du sucre en présence d'environ 40 à 70% en masse de solvant du mélange

total et de faciliter l'agitation. Le mélange réactionnel est analysé à 0, 4 et 6 h de réaction en chromatographie sur perméation de gel (CPG) et en chromatographie gaz (GC) (154). Une méthode de cette synthèse d'ester de saccharose par activation du saccharose suivi de la réaction d'estérification est décrite selon les conditions suivantes :

- Préparation du saccharose activé



- Réaction d'estérification

Chauffage dans un bain d'huile à 90°C, 410 rpm
t : 4, 6 h

Temps	0h	4h	6h
monoester	27,7	74,1	77,0
diester	36,6	22,6	20,9
triester	24,1	3,0	2,1
tetraester	9,4	0,3	0,0
pentaester	2,1	0,0	0,0
DSmoyen	2,22	1,29	1,25

Distribution des esters et DS moyen et ester de saccharose présent dans le mélange.

Sacch. activé (poudre blanche) 26,9 g
Ester de saccharose (Ac stéar/palm = 70/30 de DS 2,22) 5,0 g
MEC 21,3 g

Figure I-18 : Réaction d'estérification en présence de MEC (154)

Le degré de substitution moyen DS est calculé comme suit :

$$DS_{\text{moyen}} = [(\text{quantité de la forme mono-substituée (wt\%)}) \times 1 + (\text{quantité de la forme di-substituée (wt\%)}) \times 2 + (\text{quantité de la forme tri-substituée (wt\%)}) \times 3 + (\text{quantité de la forme tétra-substituée (wt\%)}) \times 4 + (\text{quantité de la forme penta-substituée (wt\%)}) \times 5] \times 0,01.$$

Les résultats de GC indiquent que la réaction entre les esters de sucre et le saccharose activé a eu lieu. En effet, le DS moyen au début de la réaction apporté par les polyesters de saccharose est de 2,22. Après 4 h de réaction, le DS moyen est de 1,29 et de 1,25 après 6 h. Les résultats

obtenus montrent qu'après 4 et 6 h de réaction, le mélange réactionnel est majoritairement constitué de mono- et diester de saccharose (154).

Dans le cas où le solvant utilisé est la méthyl éthyl cétone, une étude complémentaire sur l'élimination du solvant a révélé que la méthyl éthyl cétone est plus facile à retirer que le DMSO. Cependant, la récupération des esters formés nécessite généralement plusieurs étapes de purification car les savons sont difficiles à enlever.

Schaefer et Trout ont également réalisé la synthèse des esters de sucre partiellement estérifiés en présence de DMSO comme solvant. La réaction peut être réalisée en deux ou trois étapes. Les catalyseurs basiques utilisés doivent avoir des tailles de particules inférieures à 100 μm et de préférence inférieures à 50 μm afin d'augmenter la surface de contact entre le catalyseur et les réactifs. Avant toute réaction, le saccharose et le catalyseur sont séchés sous vide pendant 12 h. Les produits de réaction sont analysés par chromatographie en phase supercritique. Dans une première étape, les polystéarates de saccharose (0,0312 mol) avec un degré de substitution de 96%, une partie du saccharose (0,0316 mol), du K_2CO_3 (0,0217 mol) et du DMSO (500 g) sont mélangés pendant 60 min. Le degré d'homogénéisation est quantifié par le nombre de Weber. La première réaction est réalisée à 120°C pendant 120 min. Une partie du produit de cette étape est analysée. Au cours de cette réaction, il y a formation de savons et consommation de tout le sucre. Dans la seconde étape, le reste de saccharose (0,439 mol) est ajouté au mélange du produit de la réaction initiale. Le degré d'homogénéité étant approprié, aucune agitation supplémentaire n'a été utilisée au-delà du simple mélange des composants pour assurer une distribution uniforme de la chaleur. La réaction est réalisée à 120°C pendant 90 min. La synthèse permet d'obtenir des esters de sucre de DS compris entre 1 et 3 (155).

Pour cette étude, les sucres utilisés sont préférentiellement les sucres non réducteurs ou des sucres dérivés. James et Smith ont décrit la synthèse des esters de sucre en absence de solvant et de catalyseur alcalin. La réaction nécessite l'utilisation de sels d'acides gras et plus spécifiquement de sels de potassium utilisés comme catalyseur.

La synthèse des esters de saccharose est réalisée en faisant réagir 0,26 mol de saccharose, 0,55 mol d'esters méthyliques (oléate, stéarate ou palmitate), 0,13 mol de sels d'acides gras de qualité analytique à des températures comprises entre 120 et 140 °C. Le suivi de la formation du produit est réalisé par chromatographie sur couche mince. L'étude a été réalisée avec divers tensioactifs anioniques : d'une part les sels de sodium, potassium, calcium et lithium de stéarate

ou oléate et d'autre part, les sels de potassium ayant une courte chaîne d'acides gras (acétique et citrique). Les résultats ont montré que les savons autres que ceux à base de potassium ne conduisent pas à la formation des esters de saccharose. De plus, seuls les sels de potassium ayant une longue chaîne grasse (oléate et stéarate) permettent de synthétiser les esters de saccharose.

L'exemple décrit dans la Figure I-19 permet d'obtenir des mono et diesters de saccharose après 4 h de réaction en présence de tensioactifs anioniques (158).

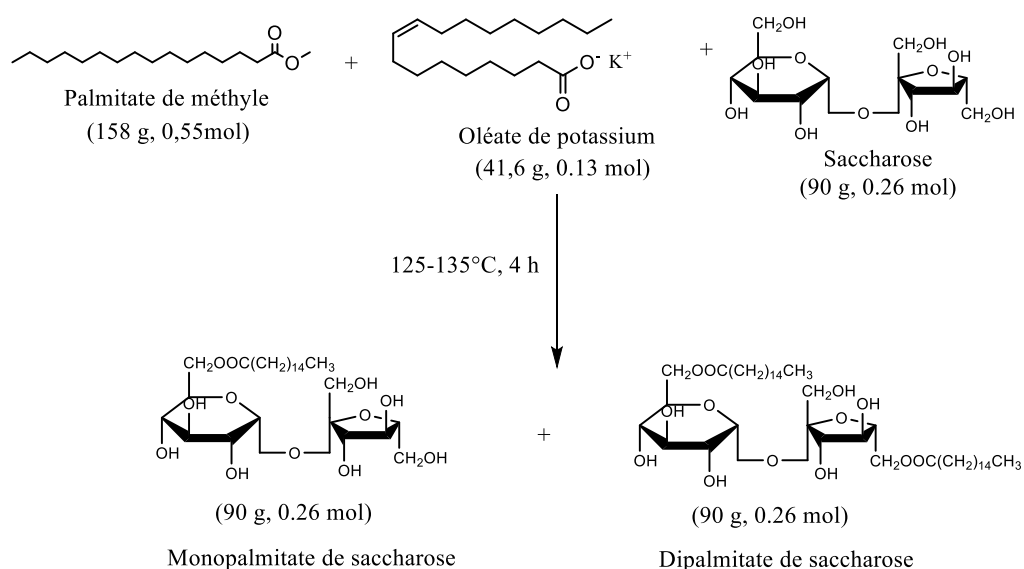


Figure I-19 : Synthèse directe des esters de sucre par un procédé sans solvant (158)

Jo et *al.* ont également décrit une méthode de synthèse des ESAG ou de leurs dérivés pouvant être utilisés dans les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. La méthode consiste premièrement à dissoudre 150 g de saccharose dans 100 mL d'eau. A cette solution aqueuse, 50 g de stéarate de sodium et 5 mL d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30 % sont ajoutés afin de réaliser une émulsion à 60°C pendant 1 h. La déshydratation de l'émulsion conduit à l'obtention d'une phase solide homogène constituée de fines particules (c'est-à-dire des particules ne dépassant pas 2,5 microns). La réaction de transestérification entre les particules de ce mélange et 70 g d'esters méthyliques de stéarate pour l'obtention des ESAG est réalisée dans un réacteur en l'absence de solvant. Lorsque la température est à 140°C, 5 g de K_2CO_3 sont ajoutés dans le réacteur. La température est alors élevée à 160°C et la pression est comprise entre 20 et 60 mmHg et le mélange agité pendant 4 h. En l'absence de peroxyde

d'hydrogène, le taux de conversion du stéarate de méthyle en stéarate de saccharose est inférieur à 30 %. L'ajout du peroxyde d'hydrogène permet d'atteindre un taux de conversion supérieur à 85 %. Les analyses du produit par chromatographie sur couche mince révèlent la présence des mono-, di- et tri-stéarates de saccharose. Le peroxyde d'hydrogène pouvant être utilisé comme agent d'émulsification dans la première étape puis comme catalyseur au cours de la réaction de transestérification dans la seconde étape (159).

Les synthèses réalisées aussi bien en présence de solvant ou en leur absence font intervenir la notion de micronisation par le contrôle de la taille des particules. La micronisation est un terme utilisé pour décrire une technique de réduction de la taille dans laquelle la distribution granulométrique résultante est inférieure à 10 µm. Dans le cas de Schaefer et Trout, la taille des particules dispersées, notamment du catalyseur K_2CO_3 , la présence du polystéarate de saccharose utilisé comme émulsifiant permettent d'obtenir un milieu aussi homogène que possible. Cette méthode permet d'augmenter la surface de contact entre les réactifs (155). Dans le cas de Jo et *al.*, la taille des particules est contrôlée par la méthode de déshydratation de l'émulsion. Cette dernière méthode nécessite l'apport d'énergie supplémentaire au cours du séchage et également constitue une étape supplémentaire dans le processus d'obtention des esters de sucre d'acides gras (159).

Le Tableau I-12 regroupe des exemples de synthèse par transestérification des esters de sucre à faible degré de substitution. Les conditions de réactions et les résultats obtenus y sont brièvement décrits.

Tableau I-12 : Exemples de la synthèse des esters de sucre par voie chimique

Matières premières	Donneur d'acyle	Milieu	Conditions de réaction	Protocole	DS	Référence
Saccharose	Esters vinyliques d'acides gras en C8, C12, C14 et C16	Solvant	Catalyseur : Na ₂ HPO ₄ anhydre Solvant : DMSO Ratio saccharose/ester vinylique 4:1 Température : 40 °C Temps : 5 h	Dissolution du saccharose dans le DMSO Ajout du Na ₂ HPO ₄ anhydre Ajout de l'ester vinylique Transestérification à 40°C.	1 à 2	(157)
Mono et disaccharides	Esters vinyliques d'acides gras C18:0	Solvant	Catalyseur : K ₂ CO ₃ Solvant : DMSO Ratio saccharose/ester vinylique 2:1 à 8:1 Température : 60 °C Temps : 30 min	Dissolution du saccharose dans le solvant en présence du catalyseur Ajout de l'ester vinylique après filtration ou décantation du catalyseur n'ayant pas réagi.	1	(156)
Saccharose	Ester de saccharose	Solvant	Catalyseur : KOH Solvant : eau-éthanol Température : 60 °C Temps : 30 min Emulsifiant : esters partiels (DS ~2) Solvant : Méthyl éthyl cétone	Activation du saccharose Transestérification	1 à 2	(154)

				Température : 90 °C Temps : 3-10h			
Saccharose	Polyesters de saccharose (acide stéarique substitué à 96%)	Solvant		Catalyseur : K ₂ CO ₃ Solvant : DMSO Emulsifiant : esters partiels, DS supérieur à 95% (1 à 8) Température : 80-140 °C	Homogénéisation des réactifs par un tensioactif anionique et micronisation des particules moléculaires	1 à 3	(155)
Saccharose, sorbitol, méthyl glucoside, lactitol	Esters d'acides gras	Sels d'acides gras		Catalyseur et émulsifiant : sel de potassium d'acides gras Température : 120-135 °C Temps : 5 h	L'ester méthylique d'acides gras est mélangé avec le sel de potassium d'acides gras et le sucre. Micronisation des particules moléculaires	1 à 2	(158)
	Mono-, diesters d'acides gras de méthyle, éthyle ou propyle	Sels d'acides gras		Catalyseur : K ₂ CO ₃ , KOH Emulsifiant : stéarate de sodium Température : 60 °C Temps : 1 h	Catalyseur : K ₂ CO ₃ , KOH Température : 140-175 °C Temps : 4 h Pression : 20-60 mmHg	1 à 3	(159)

c. Réaction en émulsion

Parmi les voies de synthèses n'utilisant pas de solvants, on peut citer les réactions réalisées en émulsion ou microémulsion en présence de tensioactif. Ce type de milieu a été étudié pour la synthèse des ESAG afin d'améliorer la surface de contact entre les réactifs.

Claverie *et al.* (160) ont décrit un procédé de synthèse des esters de saccharose à faible degré de substitution en présence d'un émulsifiant et d'un catalyseur basique. La synthèse est réalisée en deux étapes principales. Une étape de prémélange des réactifs dont les paramètres clés sont : le mode d'agitation, la température et la composition du mélange. Pour cette étape, un diagramme de phase pseudo-ternaire constitué des esters méthyliques/saccharose/esters de saccharose a été réalisé sous agitation mécanique et les différentes phases ont été analysées au microscope polarisant (Figure I-20). Le diagramme a révélé 4 zones : émulsions H/E laiteuse fluide, H/E consistante puis fluide, E/H et isotrope huileux dont les gouttelettes étaient de taille supérieure à 100 μm . Afin de stabiliser les émulsions et d'améliorer la mise en contact des réactifs, la taille des particules a été réduite en changeant la méthode d'agitation et en étudiant l'impact du catalyseur. Les résultats obtenus montrent que l'agitation avec un homogénéisateur rotor/stator diminue considérablement la taille des particules et en présence de K_2CO_3 , les agrégats sont de 30 μm quelle que soit la zone (Tableau I-13). Ces résultats ont permis d'identifier que l'émulsion H/E laiteuse maintient les réactifs non miscibles et favorise la réaction. Cette étude a également révélé que la dispersion préférentielle du catalyseur K_2CO_3 dans la phase grasse joue un rôle primordial dans la réactivité.

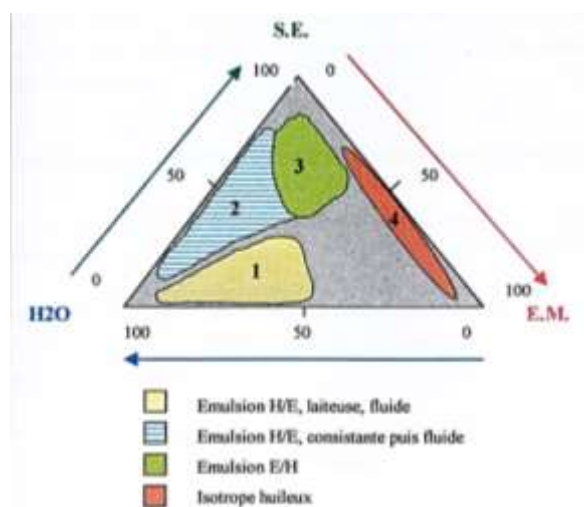


Figure I-20 : Diagramme de phase pseudo-quaternaire pour les esters de saccharose réalisés avec le mélange ester méthylique/sucre- H_2O /sucroester

Tableau I-13 : Résultats sur l'étude de la taille des globules des émulsions des esters de saccharose selon la méthode d'agitation

	Agitation mécanique classique 1000 t/min	Agitation émulseur rotor/stator 3000t/min	K ₂ CO ₃ + rotor/stator 3000 t/min
Zone 1	>100 µm	15 µm	30 µm
Zone 2	>100 µm	5-10 µm	30 µm
Zone 3	>100 µm	30 µm	30 µm
Zone 4	>100 µm	30 µm	30 µm

L'étape suivante est la formation des esters de saccharose. La synthèse est réalisée sous vide afin de retirer le méthanol formé au cours du temps. Le mécanisme de formation des esters de saccharose proposé se décline comme suit : la première étape consiste en l'adsorption des réactifs à la surface du catalyseur où se déroule la réaction. Le groupement carbonyle est activé par délocalisation de ses électrons π (Figure I-21) (161,162). La réaction est donc favorisée à l'interface et un hydroxyle du saccharose peut réagir facilement. La présence d'esters de saccharose au cours de cette étape d'émulsion/dispersion permet de stabiliser le milieu. La deuxième étape est la désorption des produits de la réaction. L'étude expérimentale et théorique a également révélé que la réaction passe par un intermédiaire de DS=6 avec transfert d'acyles de cet intermédiaire vers le sucre (160) (Figure I-22).

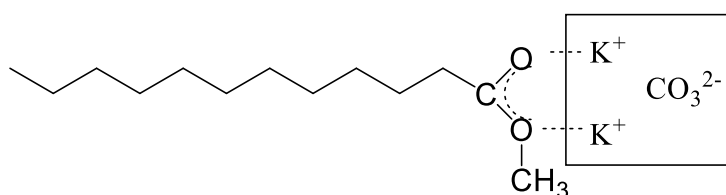
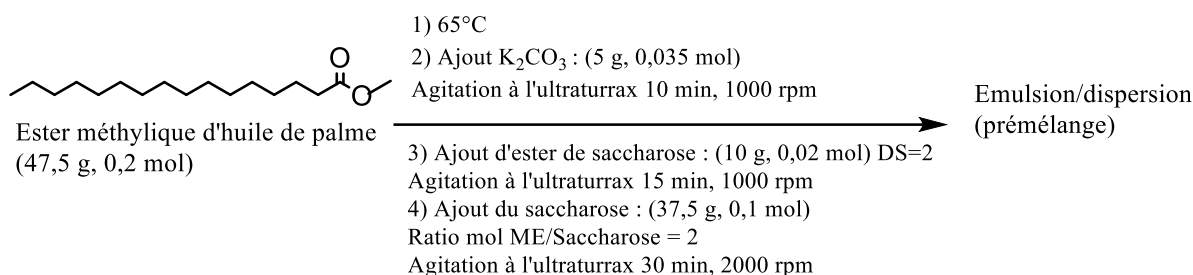


Figure I-21 : Adsorption des esters méthyliques à la surface de K₂CO₃ (161,162)

Le déroulement de ce procédé de synthèse est présenté ci-dessous :

- Préparation de l'émulsion



- Réaction de transestérification

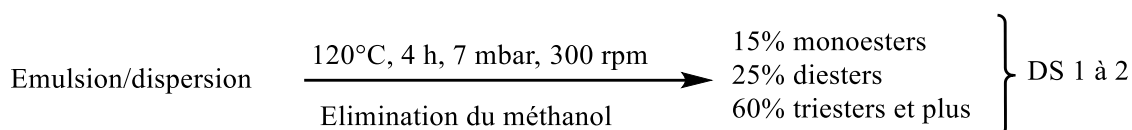
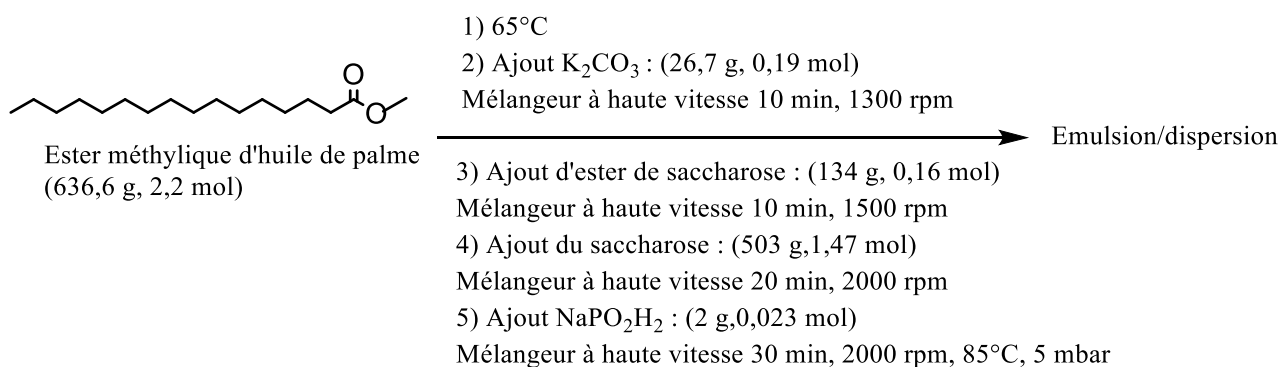


Figure I-22 : synthèse d'ester de sucre par un procédé d'émulsification (160)

Le et *al.* ont décrit la synthèse d'esters de saccharose par un procédé d'émulsification dans le but d'améliorer la couleur des produits obtenus. Contrairement au procédé précédent, celui-ci fait intervenir successivement l'utilisation de deux catalyseurs basiques : K_2CO_3 et NaH_2PO_2 , le mécanisme de cette réaction est similaire à celui décrit par Claverie et *al.* (160). Les résultats obtenus en mono et diesters sont sensiblement similaires à ceux obtenus dans l'exemple précédent (163). Ci-dessous, un exemple de synthèse de ce brevet (Figure I-23) :

- Préparation de l'émulsion



- Réaction de transestérification

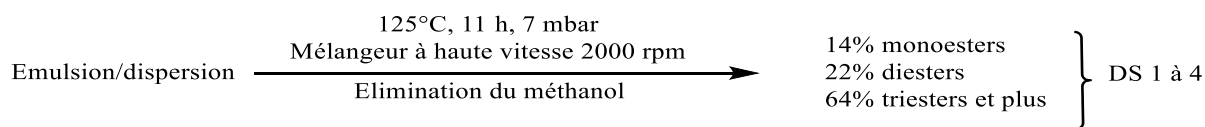


Figure I-23 : Procédé de synthèse d'ester de sucre par un procédé d'émulsification (163)

Zhao et *al.* ont réalisé la synthèse d'esters de saccharose dans des conditions anhydres par catalyse hétérogène basique en présence d'esters méthyliques comme donneurs d'acyle. Dans leur travail, ils ont étudié la solubilité du saccharose dans les esters méthyliques avec et sans ajout de sels d'acides gras ou d'esters de saccharose. L'étude a révélé que l'utilisation de ces composés permet d'augmenter la solubilité du saccharose et de générer une microémulsion. Le mécanisme de la réaction de synthèse des esters de saccharose consiste en trois principales étapes. Dans un premier temps, le sucre est dissout dans l'ester en présence du tensioactif. Le sucre et l'ester s'adsorbent à la surface du catalyseur (préalablement séché) dans l'étape suivante. Le monoester de saccharose est formé à la surface du catalyseur. Dans la troisième étape, il y a désorption de l'ester de saccharose formé. Ce dernier peut d'une part contribuer à la dissolution du sucre et d'autre part subir des étapes supplémentaires d'adsorption et désorption et conduire à un polyester. 0,112 mol de saccharose et 0,335 mol de stéarate de méthyle ont été dissous à 40°C dans un système sous vide et déshydratés et désacidifiés avec de l'oxyde de calcium. La température a été portée à 120°C. Un mélangeur à moteur de 1000 rpm a été utilisé. L'analyse des produits réalisée par chromatographie liquide haute performance révèle la présence de mono-, di- et triesters (164).

Les réactions réalisées en présence d'émulsifiants non-ioniques ou en émulsion alcaline, permettent d'organiser le milieu réactionnel et donc de contrôler le degré de substitution. En effet, les études décrites ont révélé que l'intensité d'agitation, la taille des particules, la composition du milieu réactionnel dans le processus de formation de l'émulsion, etc, sont autant de paramètres intervenant dans l'organisation du milieu réactionnel. L'intérêt des synthèses des esters de sucre réalisées en microémulsion est l'absence de solvant et donc leur utilisation est adaptée en industries pharmaceutique, alimentaire et cosmétique.

Le Tableau I-14 regroupe des exemples sur la synthèse des esters de sucre à faible degré de substitution. Les conditions de réaction et les résultats obtenus y sont brièvement décrits.

Tableau I-14 : Exemples de synthèse d'esters de sucre en milieu émulsion/dispersion des esters de sucre par voie chimique

Matières premières	Etapes de la synthèse	Préparation de l'émulsion	Conditions de réaction de transestérification	Couplage des opérations	DS	Références
- Glucose et saccharose	- Adsorption - Réaction de surface	Catalyseur : K ₂ CO ₃ (5% wt)	Température : 120-140 °C Temps : 1-4 h	Réaction et élimination continue du méthanol	1 à 2	(160)
- Ester d'acides gras	- Désorption	Température : 80-100 °C Temps : 15-30 min Emulsifiant : ester de saccharose (DS 1 à 3)	Pression : 2-8 mbar	Intermédiaire réaction de DS 6 au produit de DS 2		
- Mono et disaccharides	-Activation de l'EMAG.	Catalyseur : K ₂ CO ₃ Emulsifiant : distéarates de saccharose	Catalyseur : métaux alcalins d'hypophosphite Température : 115-120 °C	Réaction et élimination continue du méthanol de l'eau	1 à 4	(163)
- Ester d'acides gras	-Préparation de l'émulsion -Transestérification	Température : 60-90 °C Temps : 15-30 min	Temps : 5-15 h Pression : 1-10 mbar			
- Saccharose	- Adsorption		Catalyseur : NaO		1 à 2	(164)
- Méthyl stéarate	- Réaction de surface - Désorption		Emulsifiant : stéarate de saccharose (70% de monoesters), sodium stéarate Température : 120 °C			

Conclusion

La synthèse des esters de sucre d'acides gras fait l'objet de nombreuses recherches. En effet, le marché actuel des tensioactifs est largement représenté par ceux issus de la pétrochimie qui soulèvent différents problèmes quant à leur impact sanitaire et environnemental. Dans le cadre de ce travail, l'intérêt est porté sur des méthodes de fabrication des tensioactifs non ioniques en particulier les esters de sucre d'acides gras qui présentent des avantages quant à leur fabrication et leur impact environnemental. Les esters de sucre recherchés sont ceux ayant un faible degré de substitution car ils présentent des propriétés pouvant être utilisées dans diverses applications.

Les recherches effectuées ont révélé que la synthèse par voie enzymatique est celle qui est la plus décrite dans la littérature. Elle présente un caractère plus régiosélectif que la synthèse par voie chimique. Les problèmes rencontrés pour cette voie de synthèse sont la nature des enzymes et des solvants ainsi que les temps de réaction relativement longs. Les produits obtenus présentent un faible degré de substitution.

D'autres voies de synthèse telles que l'utilisation des liquides ioniques et des DES en tant que solvant de réaction de même que l'application d'ultrasons sont également en voie d'étude car ils permettent de répondre à certains défis rencontrés en synthèses chimiques et enzymatiques notamment le contraste de la réactivité chimique catalytique par la maîtrise des propriétés physiques des milieux (viscosité, densité...) et la mise en œuvre des réactions réversibles à de faibles températures.

Les synthèses des esters d'oligo et de polysaccharides sont également étudiées. La synthèse des esters de pectine réalisée par voie enzymatique a conduit à un produit de faible degré de substitution.

Enfin, la synthèse par voie chimique des esters de sucre d'acides gras est celle qui est la plus répandue en industrie et elle a fait l'objet de plusieurs brevets. Les procédés développés visent à résoudre différents problèmes tels que l'immiscibilité des réactifs, la viscosité, la dégradation des sucres, le contrôle du degré de substitution, la régiosélectivité rencontrés au cours des synthèses. Il en ressort qu'en contrôlant les paramètres de la réaction (la taille des particules, la nature et ratios des réactifs, des solvants et des catalyseurs ainsi que la température, la pression, la durée de la réaction...), on parvient à obtenir des esters de sucre d'acides gras de faible degré de substitution.

Il en ressort que la maîtrise des étapes d'émulsification (dispersion par des techniques appropriées) est préalable à l'étape de couplage des séquences de réactions de transfert d'acyle et de soutirage du co-produit notamment le méthanol. Dans ces conditions de réactions sous contrôle cinétique et thermodynamique, on parvient à obtenir des esters de sucre de faible degré de substitution.

Les graines de chia et les amandes de *I. gabonensis* sont des bioressources oléoprotéagineuses présentant divers intérêts pour des applications alimentaires, pharmaceutiques (et) cosmétiques et industrielles. La graine de chia représente une source importante de mucilage et donc de polysaccharides pouvant être utilisés dans la synthèse des esters de sucre d'acides gras. *I. gabonensis* pourrait être utilisé comme source lipophile pour l'obtention des esters de sucre d'acides gras grâce. En effet, cette espèce constitue une source d'acides laurique et myristique dont les propriétés physico-chimiques et biologiques (stabilité thermique, longueur des chaînes, contribution au métabolisme cellulaire) justifient leurs applications industrielles. Ils rentrent notamment dans la synthèse d'ester de sucre. Les esters de sucre des acides laurique myristique présentent des propriétés émulsifiantes, moussantes et biologiques valorisables dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et cosmaceutiques. Il est ainsi possible de réaliser la construction d'une chaîne de valeur ajoutée par les études de couplages chimiques entre le mucilage de chia et les acides laurique/myristique par la synthèse d'esters de sucre, de saccharides et de polysaccharides d'acides gras C12:0/C14:0.

Chapitre II :

Matériels et méthodes

II.1. Matériels

Les graines de chia de la variété Oruro[®] ont été fournies par la société Panam (Villemur/Tarn, 31). Ces graines ont servi à l'extraction du mucilage. Les amandes de *I. gabonensis* ont été achetées sur le marché de Mont-Bouet à Libreville au Gabon.

La lipase *Candida rugosa* a été fournie par Lyven. Elle possède une activité catalytique égale ou supérieure à 2 U/mg. 1 U correspond à la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mole d'acide oléique par minute à pH 8,0 et 40 ° C.

Le carbonate de potassium (K_2CO_3) et le chlorure de choline (99%) ont été achetés chez Acros Organics (99%). L'acide dodécylbenzène sulfonique (ADBS) (98%), l'acide laurique (98%) et le glucose (99,5%), le laurate de méthyle (98%), l'acide laurique (98%) et l'acide myristique (99%), l'acétate d'éthyle, l'acétone, le méthanol, le chloroforme, le dichlorométhane, le cyclohexane, l'éthanol sont de chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallaver, France).

Les solvants deutérés D_2O (99,9%), chloroforme et DMSO (99,8%) ont été achetés chez Eurisotop (Saint Aubin, France).

II.2. Méthodes d'extraction

II.2.1. Méthode d'extraction du mucilage

a. Colonne à ultrasons

L'appareil utilisé est le modèle LIXEA FORMULATOR C80-500-PI, de la marque SINAPTEC. Une colonne à ultrasons conçue expressément pour l'extraction des mucilages a été utilisée (Figure II-1). La colonne comprend un cylindre de section DN80 d'une longueur de 50 cm pour un volume de 3,1 L. Elle possède quatre générateurs d'ultrasons de 500 W chacun répartis sur 4 zones du cylindre, soit une puissance volumique d'environ 650 W/L. Chaque générateur est relié à 8 transducteurs de 22 kHz qui fournissent les ultrasons. La puissance de chaque générateur est réglée au moyen du logiciel NEXTGEN 2001. Les générateurs sont refroidis par un flux d'air comprimé permettant au système d'opérer jusqu'à des températures de 80°C.

Le milieu est agité en mode batch à l'aide d'une pâle reliée à un moteur IKA Eurostar 100 control. Ce moteur possède une interface RS232/USB permettant une connexion RS232 ou USB à l'ordinateur et un couple suffisant pour des milieux très visqueux. Les données obtenues de la sonde de température et du moteur d'agitation sont récupérées sur ordinateur grâce au logiciel de communication gratuit Comtools v2.4.4.0 qui génère l'envoi de commandes de façon régulière.

155 g de graines de chia et 2945 mL d'eau déminéralisée sont agités pendant 2 min avant le chargement dans le réacteur. Cette étape permet le gonflement du mucilage à la surface de la graine. La colonne est fermée et l'extraction se fait en mode pulsé en appliquant le programme suivant : vitesse d'agitation (1000 rpm), amplitude des ultrasons (100%), modes de pulsation (5s on/20s off). Deux lots de mucilage ont été extraits en fonction du temps d'extraction : un lot de mucilage obtenu après 20 minutes d'extraction et un autre à 50 minutes d'extraction. A la fin du temps fixé pour l'extraction, la colonne est vidée par le robinet de vidange et l'extrait aqueux est séparé des graines démucilaginées par filtration sur un tamis métallique de 1 mm puis 0,5 mm.



Figure II-1 : Montage de la colonne à ultrasons en mode batch

b. Séchage du mucilage

- Matière sèche

Le taux de matières sèches du mucilage aqueux et des graines démunclaginées est déterminé en séchant les échantillons dans une étuve chauffée à 103°C. Les échantillons sont retirés de l'étuve après 4 h de temps minimum et refroidis dans un dessiccateur puis pesés. Le rendement en matière sèche est calculé comme suit :

$$\% \text{ Matière sèche} = \frac{\text{masse sec}}{\text{masse humide}} \times 100$$

- **Lyophilisateur**

Le mucilage aqueux et les graines dé mucilaginé es sont séchés par lyophilisation. L'appareil utilisé est un lyophilisateur Cryo-Rivoire d'un volume de 80 L. Il permet de sécher l'échantillon par les phénomènes de surgélation à faible température (-40°C) puis sublimation de la glace par l'application d'un vide poussé (jusqu'à 0,2 mbar). Dans une plaque en inox, on verse environ 1 L d'extrait mucilagineux d'environ 1 cm d'épaisseur. Des thermocouples sont placés dans les échantillons pour suivre l'évolution du séchage. Le programme de lyophilisation est le suivant :

- Refroidissement de l'échantillon à - 40°C : jusqu'à 5°C à 0,5°C/min, de 5°C à -5°C à 0,1 °C/min, de -5°C à -20°C à 0,2°C/min et de -20°C à -40°C à 0,5°C/min.
- Sublimation -40°C à -12,5°C à 0,2°C/min, de -12,5°C à 2,5°C à 0,1°C/min et enfin de 2,5°C à 20°C à 0,2°C/min.

II.2.2. Extraction et hydrolyse du beurre de *I. gabonensis*

a. Extraction par solvant du beurre

La teneur en huile des amandes a été déterminée par la méthode normalisée au soxhlet décrite selon la norme AFNOR NF EN ISO 659 (1998). Les amandes ont été concassées puis broyées en poudre très fine à l'aide d'un broyeur à café. 38 g de la poudre obtenue a ensuite été placée dans le soxhlet et le cyclohexane a été utilisé comme solvant d'extraction. L'extraction a été réalisée à 50°C pendant 7 h. Après extraction, le solvant est retiré à l'aide d'un évaporateur rotatif et la masse d'huile obtenue est pesée. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique en fonction de la matière sèche de la poudre des amandes.

b. Extraction du beurre par pressage à chaud

Le pressage à chaud des amandes a été réalisé en utilisant une presse monovis (Komet, Allemagne). Le débit maximum théorique de la presse étant de 4 à 7 kg/h, des échantillons de 250 g à 5 kg peuvent être traités. Les masses en amandes étaient de 1,255 kg, 1,120 kg et 2,440 kg. La longueur de vis est de 18 mm et le diamètre est de 12 mm. Pour le pressage des amandes, une vitesse d'écoulement de 1 kg/h a été appliquée. La Figure II-2 présente la presse qui a été utilisée.



Figure II-2 : Presse monovis utilisée pour le pressage des graines

Les amandes ont été concassées préalablement afin de réduire leur taille. Le chauffage de la presse est réalisé au moyen d'un manchon chauffant. Différentes expériences de pressage ont été réalisées. Pour la première expérience, un orifice de 6 mm et un tour de 1 mm ont été utilisés. Les températures de l'anneau chauffant, de la tête de vis, de sortie de beurre et du tourteau étaient respectivement de 400, 90-120, 60 et 70°C. Au cours du pressage, la formation d'une pâte à l'intérieur de la vis a rendu difficile l'extraction de beurre. Afin de faciliter le pressage, d'autres expériences ont été réalisées en changeant les paramètres de la presse : orifice : 7 et 8 mm, tour : 1 et 1/2. Le tourteau obtenu à la suite du pressage des amandes a également été pressé dans un deuxième cycle pour optimiser l'extraction du beurre. Après pressage, le beurre obtenu est solide à température ambiante. Il est liquéfié à 50°C dans une étuve puis centrifugé à 10 000 g à 30°C pendant 10 min afin d'éliminer les impuretés.

c. Détermination des indices normés

L'indice d'acide de beurre est obtenu selon la méthode AOCS Cd3d-63 (2006). L'indice de saponification de beurre a été déterminé selon la méthode AFNOR NF EN ISO 3657 (2013).

d. Hydrolyse du beurre de *I. gabonensis*

L'hydrolyse du beurre a été réalisée selon un protocole opératoire établi en 2004 au Laboratoire de Chimie-Agro-industrielle et réalisé sur les huiles végétales fluides de colza et de tournesol (165,166). Cette étude met en œuvre une enzyme, la lipase de *Candida rugosa* ayant une activité

catalytique supérieure ou égale à 2U correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire à la libération de 1 μmol d'acide oléique par minute à pH 8 et à 40°C. L'hydrolyse du beurre est réalisée dans un réacteur batch (bêcher double enveloppe) de 1 L. Le beurre de *I. gabonensis* et l'eau (ratio massique huile/eau 1/1 g/g) sont mélangés et le tout est porté à 50°C afin de dissoudre la graisse. La température est ensuite ramenée à 40°C avant l'ajout de l'enzyme. La lipase, en quantité de 1% de la masse en triglycérides et préalablement dissoute dans de l'eau, est ajoutée dans le réacteur. Le mélange est agité à 800 tr/min à l'aide d'un homogénéisateur (model L4RT, Silverson Machines LTD. Chelsam, England) à 40°C pendant 3 h. Cette agitation convient à l'activation des réactions à l'interface huile/eau réalisée par la lipase hydrosoluble. Elle permet également d'obtenir un milieu avec des gouttelettes de taille réduite et homogène. A la fin de la réaction, le mélange est centrifugé à chaud à 10000xg (centrifugeuse sigma, type 6K16). On obtient une phase organique supérieure constituée des acides gras et une phase aqueuse inférieure comprenant le glycérol et la lipase *Candida rugosa*. Les acides gras obtenus sont solides à température ambiante.

II.3. Appareils et méthodes de caractérisation

II.3.1. Caractérisation des graines et du mucilage de chia et des amandes de *I. gabonensis*

a. Chromatographie ionique

Les monosaccharides neutres constituant les polysaccharides du mucilage ont été analysés par chromatographie ionique. L'appareil utilisé est une HPIC DIONEX ICS 3000 DC-EG. Elle est reliée à une colonne Carbo-PAC PA1, une post-colonne avec une solution de 300 mM de NaOH et un passeur automatique d'échantillons AS3000. Le logiciel Chromeleon (Chromeleon Dionex 1996-2006 VERSION 6.80 SR15 (Build 4656) permet de gérer le programme d'analyse. La détection se fait par une cellule électrochimique à base de chlorure d'argent. 100 mg de mucilage lyophilisé sont hydrolysés dans 1,25 mL d'une solution d'acide sulfurique à 72% (m/m) à température ambiante. On ajoute 13,5 mL d'eau distillée au bout de 30 min et les échantillons placés dans des tubes à hydrolyse fermés sont chauffés à 100°C dans une étuve pour des durées (de 15 min à 4 h). A la fin du temps d'hydrolyse, 3,6 mL de NaOH 32% (m/m) sont ajoutés pour arrêter l'hydrolyse et l'échantillon est dilué 50 fois avec de l'eau ultra-pure. Des standards de monosaccharides sont utilisés pour la calibration : L(-) fucose, L(+) arabinose, L(+) rhamnose, D(+) glucose, D(+) xylose, D(+) galactose, D(+) mannose, D(-) fructose. Le 2-

deoxy-D-galactose est utilisé comme étalon interne (Tableau II-1). Les résultats retenus sont ceux présentant des concentrations maximums pour les différents temps d'hydrolyse.

Tableau II-1 : Données de calibrations des différents monosaccharides

Temps de rétention (min)	Monosaccharide	R ² (%)	Aire =a[monosacch.] ² +b[monosacch.]+c		
			c	b	a
5,92	Fucose	99,8775	0,0000	3,1060	-0,0178
8,12	2-deoxy-d-galactose	n.a	0,0000	n.a	n.a
13,17	Arabinose	98,3066	0,0000	3,2570	0,0055
14,30	Rhamnose	99,7350	0,0000	2,6414	-0,0057
16,77	Galactose	99,6372	0,0000	4,1535	-0,0086
20,40	Glucose	99,7816	0,0000	3,5890	0,0041
24,52	Xylose	98,6235	0,0000	5,1859	-0,0079
27,02	Mannose	99,9607	0,0000	2,2247	0,0283

b. Analyse de la teneur en protéines

La teneur en azote total des graines de chia, des amandes de *I. gabonensis* et des mucilages a été déterminée selon la norme NF V 18-100 par la méthode de Kjeldahl. L'échantillon est premièrement minéralisé à 400°C par de l'acide sulfurique concentré en présence d'un catalyseur à base de cuivre (Kjeltabs) pendant environ 1h. Pendant cette étape, la totalité de l'azote de l'échantillon est convertie en ions ammonium. Après refroidissement des tubes de minéralisation, l'échantillon est placé dans le passeur automatique Kjeltac TM 8420 couplé à l'analyseur Kjeltac 8400 qui permet l'ajout d'eau distillée puis de la soude à 40% pour transformer les ions ammonium en ammoniac. Ce dernier est transféré vers un vase contenant une solution d'acide borique à 1% et un indicateur coloré à base de vert de bromocrésol et de rouge de méthyle. Une solution de HCl à 0,1M permet de titrer le complexe bleu antérieurement formé. A l'équivalence, le nombre de moles d'acide chlorhydrique ajouté est égal à celui de l'azote dans l'échantillon. Un facteur de conversion de 6,25 est généralement utilisé pour convertir le taux d'azote en teneur de protéines. Il peut être sinon déterminé à partir des acides aminés constituant l'échantillon.

c. Analyse des acides aminés

L'analyse des acides aminés a été réalisée par chromatographie échangeuse d'ions. L'appareil utilisé est un analyseur d'acides aminés Biochrom 20+Biochrom Ltd équipé d'un système colonne + pré-colonne contenant des résines échangeuses de cations fonctionnalisées sous forme de sodium de taille 200×4,6 mm. Avant analyse, échantillons (graines, amandes et mucilage) sont hydrolysés avec de l'acide chlorhydrique à 6 N dans une étuve à 103°C pendant 24 h. Le pH des hydrolysats est ajusté à 2,2 par une solution de soude à 3 N puis le volume total est porté à 10 mL en utilisant une solution tampon de pH égal à 2,2. Les échantillons sont filtrés à 0,45 µm avant d'être analysés. Un passeur d'échantillons réfrigéré est utilisé. L'analyse est réalisée par étalonnage externe en injectant une solution standard d'acides aminés. Ces derniers sont concentrés chacun à 2,5 nmol/mL (sauf la cystéine qui est à 1,25 nmol/mL et injectés à différents volumes (10, 20, 40, 70 et 90 µL). Les échantillons sont injectés dans la colonne à des volumes de 10 à 80 µL. La séparation des acides aminés dans la colonne se fait par élution de tampons de différents pH. Les acides aminés réagissent avec la ninhydrine dans la boucle de réaction du chromatographe avant d'être détectés à une longueur d'onde de 570 nm, excepté la proline qui est détectée à 440 nm. La quantification des différents acides aminés d'un hydrolysat permet ensuite de calculer la quantité de protéines dont il est issu et de déterminer le facteur de conversion azote/protéines (167,168).

d. Analyse de la teneur en acides uroniques

La teneur en acides uroniques est déterminée par la méthode colorimétrique de Blumenkrantz (169), adaptée pour des analyses en microplaque. 25 mg d'échantillon sont placés dans une fiole jaugée de 50 mL qui est complétée à l'eau distillé. 40 µL de solution à doser sont placés dans un puits de la microplaque et 200 µL de solution acide de Na₂B₄O₇ (120 nM dans H₂SO₄ 96%) y sont ajoutés. Les échantillons sont incubés pendant 30 minutes à 100°C puis refroidis. L'ajout de 40 µL d'une solution basique de métahydroxybiphényl (200 µL de m-hydroxydiphényle dans le DMSO à 100 mg/mL et 4800 µL de H₂SO₄ (80% V/V)) conduit à la formation d'un complexe détecté à 540 nm. L'absorbance est mesurée à intervalle de 2 minutes pendant 1 h afin de réaliser un suivi cinétique et de s'assurer de la stabilisation de l'absorbance. Des valeurs d'absorbance obtenues, on retire l'absorbance de référence mesurée avant l'ajout du m-hydroxydiphényle. La concentration est obtenue par une calibration de différents standards de l'acide galacturonique (Figure II-3).

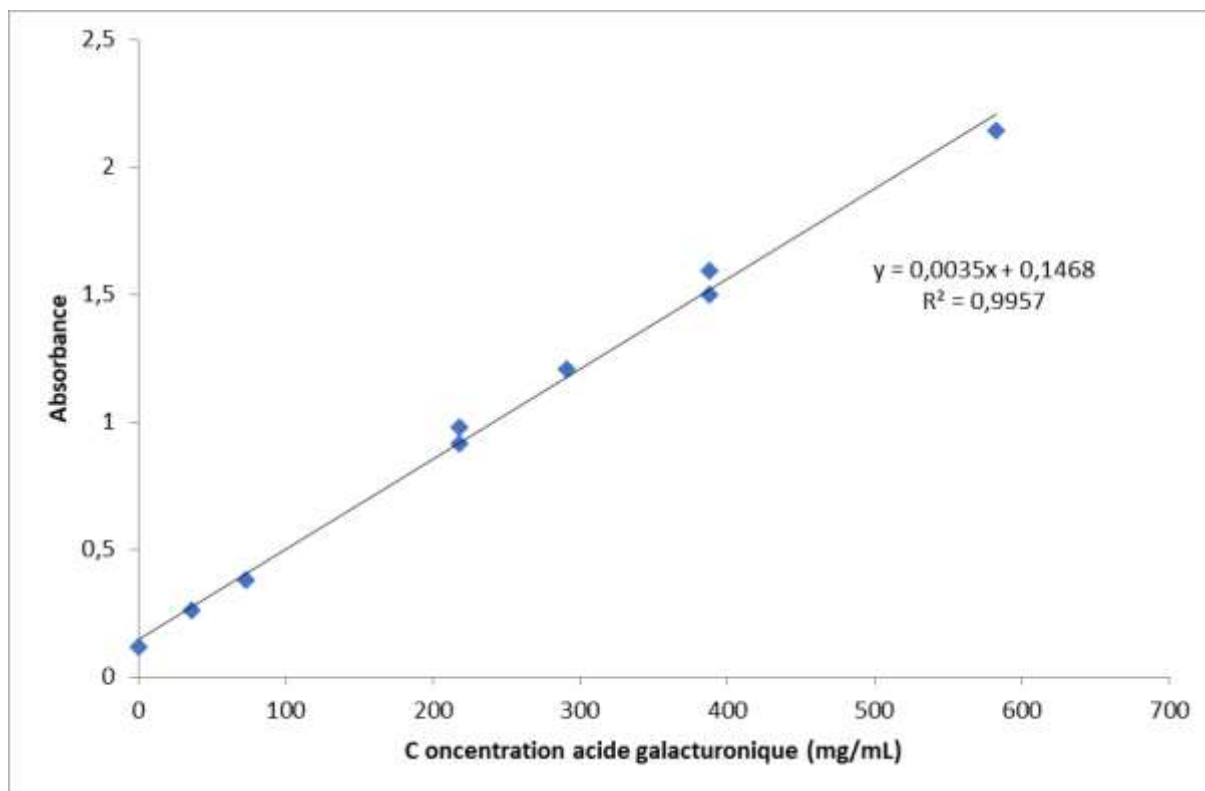


Figure II-3: Courbe de calibration de l'acide galacturonique

e. Analyses viscosimétriques

La viscosité cinématique des échantillons a été mesurée dans un bain d'eau thermostaté à 40°C avec des viscosimètres capillaires Cannon Fenske. Les constantes capillaires des viscosimètres sont celles données pour un étalonnage à 40°C.

Le liquide est introduit dans une bulle du viscosimètre à l'aide d'une pompe à vide et on ferme l'extrémité du tube du viscosimètre afin d'éviter que le liquide ne s'écoule. Le viscosimètre est ensuite placé dans un bain d'eau à 40°C pendant environ une dizaine de minutes. Lorsque le liquide atteint la température de 40°C, le bouchon est retiré, le mucilage monte dans l'autre tube de viscosimètre. Le temps mis par le liquide pour parcourir successivement deux ménisques du viscosimètre est mesuré (Figure II-4).

La viscosité (η) est obtenue en multipliant le temps (t_i) d'écoulement du liquide entre deux ménisques à la constante de la distance (k_i) correspondante. La viscosité s'exprime en cSt (mm^2/s) et est calculée comme suit :

$$\eta = [(k_1.t_1)+(k_2.t_2)]/2$$



Figure II-4 : Dispositif de mesure de la viscosité cinématique avec un viscosimètre dans un bain à 40°C

La viscosité intrinsèque, définie comme la limite de la viscosité spécifique lorsque la concentration en polymère dissout tend vers zéro, est calculée en mesurant les viscosités obtenues à différentes concentrations de solution. La viscosité intrinsèque (exprimée en dL/g), est reliée au volume hydrodynamique occupé par les molécules ; elle dépend de la conformation des molécules et de la rigidité des chaînes de polymères.

La viscosité intrinsèque peut être calculée selon différentes méthodes :

La méthode de Solomon :
$$[\eta] = \frac{2(\eta_{rel}-1-\ln\eta_{rel})^{(1/2)}}{c}$$

Où c (g/dL) est la concentration, η_{rel} est la viscosité relative. L'avantage de cette équation est qu'il s'agit d'une mesure en un point et qu'elle ne nécessite pas plusieurs dilutions du milieu.

La méthode de Kraemer : $\frac{\ln \eta_{rel}}{c} = [\eta] - k[\eta]^2 C$ $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (1/c \ln \eta / \eta_0)$

La méthode de Huggins : $\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + kH[\eta]^2 C$ $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{sp}/c)$

Où η_0 représente la viscosité du solvant pur, η_{rel} est la viscosité relative ($\eta_{rel} = \eta/\eta_0$) et η_{sp} la viscosité spécifique ($\eta_{sp} = (\eta - \eta_0)/\eta_0$).

Les méthodes de Kraemer et Huggins, en revanche, ont besoin des valeurs de la viscosité mesurée à différentes concentrations de mucilage.

f. Chromatographie par perméation de gel

La chromatographie par perméation de gel a permis de déterminer un ordre de grandeur de la taille des polysaccharides du mucilage et des produits de synthèse. L'appareil utilisé est de type DIONEX Summit ASI100 avec un passeur d'échantillons, une pompe P580 et un four. Deux colonnes PL aquagel OH Mixed 8 μ m montées en série sont thermostatées à 40°C et couplées à un appareil VARIAN 350 détecteur RI. L'éluant utilisé est de l'eau ultra-pure avec 1% d'azide de sodium à un flux de 0,8 mL/min et une température d'analyse de 40°C. Le logiciel de traitement des données utilisé est Chroméléon. La calibration est réalisée à partir de polysaccharides standards de masses molaires comprises entre 5,8 kDa et 788 kDa.

g. Cryo-MEB (microscope électronique à balayage)

Les observations des graines de chia (entières et hydratées) et des amandes de *I. gabonensis* (entières) par cryo-microscopie à balayage ont été réalisées au sein de la plateforme GENOTOUL, au Centre Microscopique Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB). L'appareil utilisé est un MEB Quanta FEG FEI avec un module de cryo-préparation Quorum PP3000T.

Cette technique fait appel à des électrons pour observer la surface d'un échantillon. A la différence du microscope optique qui permet l'observation au travers d'un faisceau de lumière, le microscope électronique place l'échantillon sur un chemin où passe un faisceau d'électrons. Cette opération permet un grossissement plus important et plus précis de l'objet à observer. Le principe de la méthode consiste à refroidir l'échantillon afin de l'observer dans son état hydraté.

De façon pratique, les échantillons ont été préparés par la méthode de refroidissement à l'azote liquide pâteux (température de -210°C) afin de minimiser la cristallisation de l'eau et de l'obtenir à l'état amorphe. L'échantillon est ensuite sublimé afin d'éliminer l'eau à la surface, puis fracturé à l'aide d'un mini-scalpel (cryo-fracture) et métallisé avant d'être observé.

II.3.2. Analyse qualitative et quantitative du beurre de *I. gabonensis*

a. En chromatographie en phase gazeuse

Le profil des acides gras a été réalisé par chromatographie en phase gazeuse. Celle-ci consiste en une méthylation des acides gras à l'aide du TMSH (hydroxyde de triméthylsulfonium à 0,2 M dans le méthanol). 15 mg de beurre sont pesés et dissous dans 1 mL de TMBE (*ter*-butyl méthyl éther). 100 μL de cette solution sont prélevés et 50 μL de TMSH y sont ajoutés. Les esters méthyliques d'acides gras obtenus sont analysés par chromatographie en phase gazeuse. L'appareil utilisé est un chromatographe Varian 3900 équipé d'une colonne capillaire CP-Select CB for FAME fused silica WCOT (50 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et 0,25 μm d'épaisseur de film, injection split 1:100). L'analyse dure 55 min, Au cours de l'analyse, 1 μL d'échantillon est élué par de l'hélium, utilisé comme gaz vecteur, à un débit de 1,2 mL/min. La température du four est de 185°C pendant 40 min, puis augmente à une vitesse de $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à 250°C et se maintient pendant 10,68 min. Le détecteur FID et l'injecteur ont une température de 250°C . L'identification et la quantification des pics des acides gras ont été réalisées au moyen du mix 37 de supelco (standard constitué d'un mélange d'acides gras).

b. Profil glycérique

Le profil glycérique du beurre a été déterminé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les composés sont identifiés par comparaison des temps de rétention avec des standards de référence (acides gras C10:0, C12:0, C14:0 et C16:0, ainsi que leur mono, di, triester) et la quantification est réalisée par étalonnage interne. La méthode consiste en une silylation des échantillons en utilisant comme réactif le MSHFBA (N-méthyl-N-triméthylsilyl-heptafluorobutyramide). A 10 mg de beurre sont ajoutés 100 μL d'une solution d'étalon interne (heptadécane à 10 mg/mL de cyclohexane). Ce mélange est complété à 10 mL de cyclohexane. Dans un insert, 160 μL de la solution précédente sont additionnés à 40 μL de réactif de silylation (MSHFBA). L'analyse a été réalisée en utilisant une colonne Rtx-5 (Restek) (longueur : 15m, diamètre interne : 0,32 mm épaisseur de film : 0,25 μm). Le volume d'injection est de 1 μL et le gaz vecteur, l'hélium, est à une pression de 15 psi en tête de colonne.

La température à l'intérieur de la colonne est de 55°C pendant 0,5 min puis augmente (200°C/min) jusqu'à 340°C et se maintient pendant 40 min. La température du four est de 55°C pendant 0,5 min, puis augmente (45°C/min) jusqu'à 80°C, augmente (10°C/min) jusqu'à 360°C et se maintient pendant 16 min. La température du détecteur est de 365°C.

c. Analyse des phospholipides

Les amandes ont été broyées à sec dans un moulin à café puis mélangées à du méthanol dans un rapport 1/10 (m/V). La solution est homogénéisée pendant une minute au moyen d'un broyeur ultraturrax. Du chloroforme est ajouté pour être dans un rapport solide/solvant 1/30 (m/V) et le mélange est homogénéisé pendant 2 min. L'ensemble est centrifugé et le surnageant est filtré puis conservé tandis que le résidu est repris dans le même volume d'une solution de chloroforme/méthanol (2/1 v/v) homogénéisé 3 min. Le résidu est traité 3 fois et les phases surnageantes sont rassemblées et représentent un volume V. Le mélange est agité puis laissé à décanter. La phase supérieure est éliminée et la phase inférieure représente un volume V'. A ce volume, on ajoute un volume V'/4 d'une solution de méthanol/KCl 8,8 g/L (1/1 v/v). Le mélange est agité puis décanté et la phase inférieure est filtrée et séchée à l'aide de sulfate de sodium anhydre. Le solvant est évaporé à l'azote.

Les lipides polaires et non polaires précédemment extraits sont séparés par une méthode d'extraction en phase solide avec une colonne Supelclean LC-Si SPE 500 mg/6mL (Supelco). Cette dernière est conditionnée en y faisant percoler 5 mL de méthanol et 5 mL de chloroforme. Sur la cartouche SPE, on dépose 100 mg d'extrait lipidique dans 200 µL de chloroforme. Les lipides non polaires sont élués avec 5 mL de chloroforme, les glycolipides avec 10 mL d'acétone et les phospholipides sont obtenus avec 10 mL de méthanol. Le méthanol est évaporé sous courant d'azote et les phospholipides sont récupérés.

Le résidu est repris dans 1 mL de chloroforme puis éventuellement dilué suivant la teneur en phospholipides avant d'être analysé en chromatographie HPLC/ELSD. 20 µL sont injectés dans un appareil de chromatographie liquide relié à un détecteur par diffusion de lumière ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) selon la procédure adaptée de la littérature (170). La colonne utilisée est de type Lichrospher 100 diol (5µ) 150×3 mm, thermostatée à une température de 40°C et le détecteur (Alltech 3300) à une température de 35°C. L'air circule à 4 bars et un débit de 1,6 L/h. Deux éluants sont préparés (Tableau II-2) et mélangés avec un gradient de concentration dans le temps (Tableau II-3).

Tableau II-2 : Eluants utilisés pour l'analyse des phospholipides par chromatographie

Eluant A		Eluant B	
Isooctane	82%	Isopropanol	85%
Isopropanol	17%	Eau	14%
Acide acétique	1%	Acide acétique	1%
Triéthylamine	0,08%	Triéthylamine	0,08%

L'identification des phospholipides est réalisée en comparant les temps de rétention avec des standards commerciaux. La quantification est effectuée par étalonnage externe.

Tableau II-3 : Gradient d'élution des solvants en fonction du temps

	0	24'	25'	32'	33'	40'
%A	95	60			95	95
%B	5	40	100	100	5	5

d. Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique du mucilage de chia et de l'huile d'*I. gabonensis* a été réalisée au Service Analyse et Procédé (SAP) du LGC au moyen d'un analyseur thermogravimétrique SDT Q600 (TA instrument) sous atmosphère d'azote avec un débit de 100 mL/min dans une gamme de température de 25°C à 500°C avec une rampe de 10°C/min.

II.3.3. Autres méthodes de caractérisation

a. Spectroscopie Infrarouge

Un spectromètre Perkin-Elmer IR-TF (Infrarouge à transformée de Fourier) 65 spectrometer a été utilisé pour les caractérisations infrarouges des réactifs et des produits. La technique utilisée est l'ATR (réflectance totale atténuée), avec une gamme spectrale de longueur d'ondes de 4000 et 600 cm^{-1} . De façon pratique, l'échantillon est déposé sur un cristal à fort indice de réfraction dans l'infrarouge. Le cristal sert de guide d'onde au rayonnement et permet à l'onde évanescente d'interagir en surface avec l'échantillon au contact du cristal, et d'obtenir le spectre infrarouge.

b. Analyses par RMN 1D et 2D

Les analyses RMN ^1H et ^{13}C des réactifs (glucose, acides gras et esters de glucose) et les analyses 2D (COSY, HSQC et HMBC) ont été réalisées sur le site de l'INP-ENSIACET au moyen d'un spectromètre Fourier 300 (300 MHz) de la société Bruker (Karlsruhe, Allemagne). D'autres analyses complémentaires, notamment sur les esters de glucose ont été réalisées à l'Université Paul Sabatier, au service RMN G2R2. Un spectromètre Bruker AVANCE III HD NMR opérant à une fréquence de 500,13 MHz a été utilisé. Les solvants utilisés pour les réactifs et les produits sont le chloroforme deutéré (CDCl_3), le diméthyle sulfoxyde deutéré (DMSO-d_6), et l'oxyde deutéré (D_2O).

Pour les composés plus complexes (le mucilage et ses produits estérifiés), les analyses ont été effectuées au service RMN du Laboratoire de Chimie de Coordination. Les spectres RMN MAS ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER Avance III 400 (9,4 T). Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les échantillons ont été placés dans des rotors en zircone de 4 mm. La vitesse de rotation autour de l'angle magique (MAS) a été réglée entre 5 kHz et 8 kHz suivant les cas. Les expériences ont été effectuées à la température ambiante de 21°C . Les spectres d'excitation directe ^1H et ^{13}C ont été réalisés avec un délai de recyclage de 3s et 5s, respectivement. La durée des impulsions RF d'excitation a été réglée pour correspondre à des rotations de l'aimantation de 30° . Les spectres ^{13}C obtenus par polarisation croisée (CP) avec le ^1H ont été enregistrés avec un temps de recyclage de 2 s et un temps de contact de 2 ms.

c. Analyse par spectrométrie de masse

L'analyse est réalisée par l'équipe du service commun de spectrométrie de masse de l'université Paul Sabatier (UPS) à l'aide du spectromètre de masse haute résolution GCT 1er Waters. La technique d'ionisation est DCI NH_3 en introduction directe et en couplage GC/MS pour la détermination des masses exactes.

d. Analyse thermique par calorimétrie à balayage différentiel ou Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Les analyses pour la détermination des propriétés thermiques ont été réalisées en utilisant une DSC Mettler Toledo DSC1Star^e System (Perkin-Elmer, USA). L'appareil utilisé est équipé d'un système de refroidissement interne. Le gaz de purge est de l'azote à un débit de 20 mL/min.

L'indium (température de fusion de $T_f = 156,6^\circ\text{C}$, et une enthalpie de formation de $\Delta H_f = 28,45 \text{ J/g}$) et l'eau distillée ($T_m = 0^\circ\text{C}$, $\Delta H_f = 334,0 \text{ J/g}$) ont été utilisés pour l'étalonnage. Les données sont analysées en utilisant le logiciel Star^e (Mettler Toledo). Pour la réalisation de l'analyse, 4 à 10 mg environ de l'échantillon sont pesés dans des récipients en aluminium à 0,1 mg près, et les couvercles sont hermétiquement scellés avec des joints toriques. Un récipient vide en aluminium, hermétiquement scellé, est utilisé comme référence. Les rampes de température dans le calorimètre sont les suivantes : chauffage de $+25^\circ\text{C}$ à 90°C , à une cadence de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ et maintien pendant 5 min, refroidissement à -80°C à une vitesse de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, et maintien pendant 5 min. L'échantillon est ensuite chauffé à 90°C à $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Deux cycles ont été effectués. Le logiciel STARE v.16.10 est utilisé pour analyser et tracer les données thermiques.

e. Analyse de la teneur en matière grasse solide (Solid fat content)

Les quantités de solides dans les graisses en fonction de la température sont calculées à l'aide d'expériences DSC et du logiciel STARE associé. Étant donné que la teneur en matière grasse solide (SFC) dépend de la température, ces valeurs peuvent être présentées en fonction de la température. Les surfaces partielles des thermogrammes sont calculées et corrélées avec les pourcentages de solides, considérant qu'à -80°C , les échantillons sont constitués à 100% de solides.

II.4. Appareils et méthodes d'analyse des propriétés

a. Tension de surface et concentration micellaire critique (CMC)

La mesure de la tension superficielle et la détermination de la CMC sont réalisées à l'aide d'un tensiomètre à goutte automatisé Tracker-S de Teclis Instrument (Figure II-5). Pour la mesure de la tension superficielle eau/air, nous avons utilisé le principe de la goutte pendante. La solution à analyser est placée dans une seringue reliée à une aiguille par laquelle est formée la goutte. Le piston de la seringue est piloté par un moteur qui permet de réguler et contrôler le volume de la goutte formée tout le long de l'expérience. Le Tracker permet de mesurer des variations de tensions de surface comprises entre 0,1 et 100 mN/m.



Figure II-5 : Tensiomètre à goutte automatisé utilisé pour la mesure de la tension de surface

b. Spectrophotométrie UV/Visible

Le spectrophotomètre SHIMADZU 1800 est utilisé pour l'étude de la stabilité des émulsions. Il permet d'enregistrer un spectre par balayage progressif des longueurs d'ondes et peut mesurer l'absorbance à une longueur d'onde précise. La mesure est réalisée en plaçant les échantillons dans des cuvettes en plastique ou quartz.

10 g d'une solution aqueuse à 0,5% d'ester sont mélangés à 1 g d'huile de colza. Un blanc ne contenant pas d'ester est utilisé comme contrôle. La dispersion de l'ester est réalisée par homogénéisation à l'aide d'un ultraturrax à 10000 rpm pendant 2 min. 20 μ L de l'émulsion sont dilués avec 2 mL d'eau déminéralisée dans les cuvettes du spectrophotomètre. L'absorbance à 500 nm est mesurée à 0 et 20 min.

L'indice de stabilité de l'émulsion (ISE) est calculé selon la formule ci-après :

$$ISE = A_0 \times 20 / (A_0 - A_{20})$$

A_0 et A_{20} représentant les absorbances obtenues à 0 et 20 min (117).

Chapitre III :

**Traitements des matières premières :
graines de chia Oruro[®] et amandes de
*I. gabonensis***

III.1. Schéma intégré d'extraction du mucilage et production des graines démucilaginées de chia

A partir des graines oléoprotéagineuses à mucilage, nous avons levé le verrou à l'accès aux oléosomes ou corps lipidiques pour la libération de l'huile dans les graines de lin et de la caméline par les études de procédés intégrés. Elles consistent à extraire d'abord les mucilages qui constituent une barrière physique (Figure III-1). Ensuite les graines démucilaginées deviennent des substrats oléoprotéagineux dans lesquels les lipides et protéines y sont concentrés. Elles sont appropriées à la libération de ces biopolymères par voie froide et aqueuse. Dans cette partie, les résultats de caractérisation des graines de chia sèches et graines hydratées sont présentés. Par la suite, les résultats obtenus pour l'extraction et la caractérisation du mucilage sec sont décrits.

III.1.1. Caractérisation des graines de chia Oruro®

a. Composition chimique de la graine Oruro®

Les résultats obtenus sur la graine de chia Oruro® ont donné la composition suivante : $32,9 \pm 0,3$ % d'huile dont $63,9 \pm 0,2$ % représentent les acides linoléiques (oméga 3) et $18,5 \pm 0,2$ % les acides linoléiques (oméga 6), $17,41 \pm 0,21$ % de protéines et $5,08 \pm 0,06$ % de cendres. La teneur en polysaccharides, calculé par différence est de 44,61 %.

b. Composition en acides aminés

Le Tableau III-1 présente les résultats de la composition en acides aminés de la graine de chia Oruro®. La graine est composée d'acides aminés qui présentent des avantages pour la santé humaine. C'est notamment une bonne source d'acides glutamique et aspartique ainsi que d'arginine trouvés à $19,18 \pm 0,78\%$, $8,77 \pm 0,07\%$ et $10,70 \pm 0,56\%$ massique. La composition en teneur des protéines des graines de chia de la variété Oruro® est proche de celle de l'USDA. L'acide glutamique pur est utilisé pour le traitement de troubles tels que l'épilepsie, la psychose chez les enfants atteints de polio et retard mental. L'acide glutamique, mélangé à la glycine permet de contrôler l'acidité gastrique. Les acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) seraient responsables des propriétés des peptides actifs. La méthionine est utilisée pour le traitement et la prévention de l'hépatotoxicité et du diabète. La méthionine est également un antioxydant qui neutralise les radicaux libres et élimine les déchets dans le foie, aide la dégradation des graisses et la réduction du taux de cholestérol sanguin. Un mélange de

méthionine et de cystéine est utilisé pour le traitement des différents types d’empoisonnement. La cystéine peut activer l’insuline dans la circulation sanguine et peut être utilisée dans les médicaments pour les patients souffrant d’une crise d’hypoglycémie due à un taux élevé d’insuline (171).

Tableau III-1 : Composition en acides aminés dans la graine de chia Oruro®

Acides aminés	% massique relatif (cette étude)	USDA*	Nitrayová et al. (172)
Acide aspartique	8,77±0,07	8,16	5,07
Thréonine	3,98±0,00	3,43	2,14
Sérine	5,97±0,06	5,07	3,72
Acide glutamique	19,18±0,78	16,91	11,37
Glycine	4,87±0,02	4,56	3,60
Alanine	5,14±0,06	5,04	3,72
Cystéine	0,09±0,46	1,97	1,66
Valine	5,84±0,34	4,59	3,13
Méthionine	2,36±0,16	2,84	2,65
Isoleucine	4,18±0,04	3,87	2,93
Leucine	7,32±0,07	6,62	5,62
Tyrosine	3,14±0,05	2,72	2,42
Phénylalanine	5,37±0,05	4,91	4,59
Lysine	5,19±0,11	4,69	3,68
Histidine	3,22±0,20	2,57	2,42
Proline	4,68±0,15	3,75	5,07
Arginine	10,70±0,56	10,35	7,92
Tryptophane	ND**	2,11	ND*

*ND : non déterminé

**Source : USDA National Nutrient Database for Standard (2011)

III.1.2. Extraction du mucilage

La Figure III-1 montre le schéma d’extraction du mucilage. Le mucilage des graines de chia Oruro® a été extrait par cavitation ultrasonore en milieu aqueux. Après traitement, le mucilage aqueux est séparé des graines par filtration sur tamis. Le rendement d’extraction est calculé à partir de la matière sèche du mucilage aqueux. Le mucilage est ensuite séché par lyophilisation.

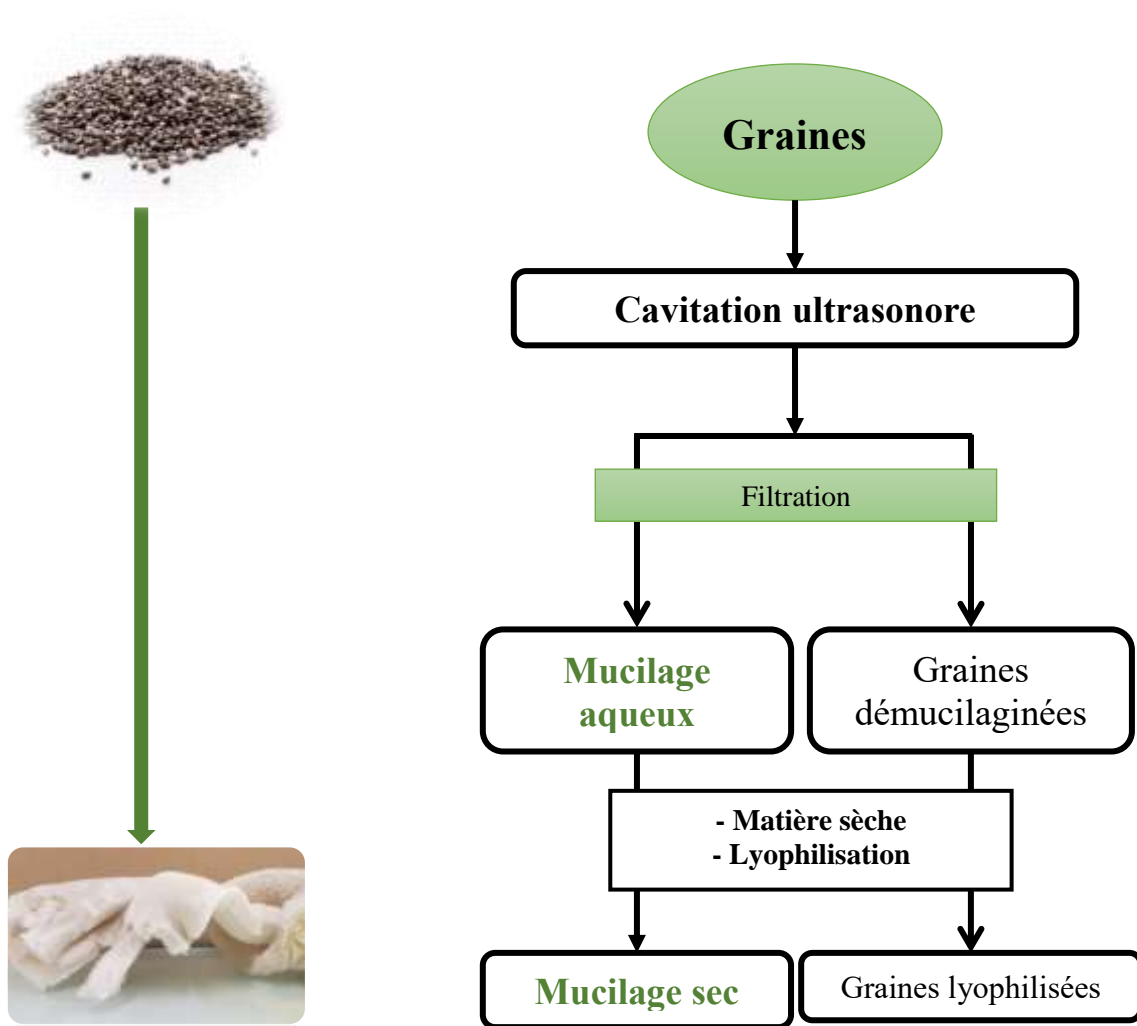


Figure III-1 : Schéma de l'extraction du mucilage de chia et de production de graines de chia démucilaginées

a. Observation au microscope des graines hydratées

L'observation à la loupe binoculaire d'une graine hydratée en présence de rouge de ruthénium a permis d'observer le mucilage formé à la surface de la graine (Figure III-2). Ce mucilage est transparent avec une épaisseur correspondant au mucilage déployé à un temps t . Ma et *al.* ont étudié le processus de formation du mucilage à la surface de la graine de chia en présence d'eau. Ils ont montré qu'au bout de 30 min, le gel formé à la surface est stable (43). La taille du noyau de la graine n'est pas altérée de façon significative. Seules les cellules de la couche externe du tégument se désagrègent.

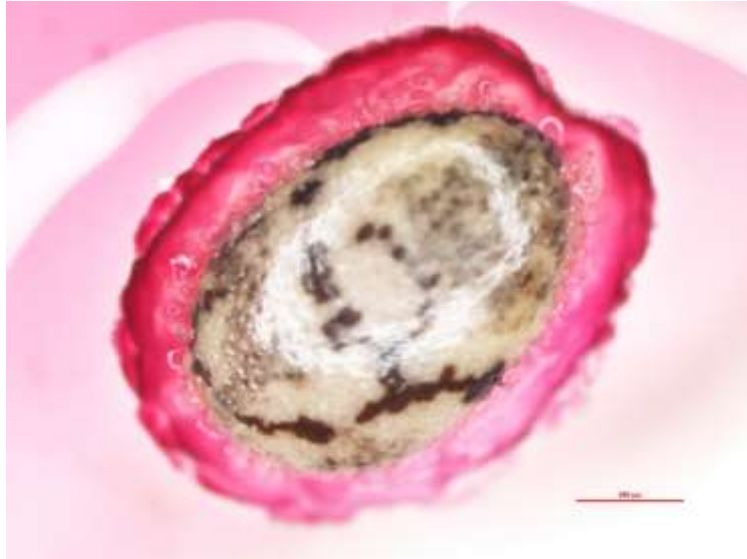


Figure III-2 : Observation au microscope optique binoculaire d'une graine hydratée colorée au rouge de ruthénium (objectif $\times 10$, échelle 500 μm)

b. Observation des graines au Cryo-MEB

La Figure III-3 montre différentes planches d'observations de la graine entière (figure III-3-a, III-b et III-c), hydratée (figure III-3-d) et démucilaginée (figure III-3-e et III-3-f). La figure III-3-e est une fracture de la graine entière sur laquelle on peut voir les différentes couches la constituant. La figure III-3-c montre que l'enveloppe de la graine (le tégument) est constituée de trois couches : une couche externe d'environ 16 μm où serait localisé le mucilage, une couche de cellules scléroïdes arrangées verticalement (28 à 30 μm environ) et l'endocarpe. Cet arrangement a été décrit dans l'étude réalisée par Muñoz *et al.* (2012) et Salgado-Cruz *et al.* (2013) (23,43). Entre les deux premières couches, on retrouve des formes hexagonales de 11 à 20 μm . Lorsque la graine est en contact avec de l'eau, des filaments de mucilage apparaissent de façon uniforme à la surface de la graine (figure III-3-d). Les figures III-3-e et III-3-f montrent la structure de la graine après démucilagination par cavitation ultrasonore. Les observations montrent que la démucilagination s'effectue au niveau de la couche externe du tégument. En effet, à la surface de la graine démucilaginée, on retrouve les formes prismatiques séparant la couche externe et les cellules scléroïdes.

Les études ont montré que les graines de chia présentent une structure de base similaire. Les différences se situent au niveau de l'épaisseur du péricarpe, la couleur et les proportions des différentes couches (23,43).

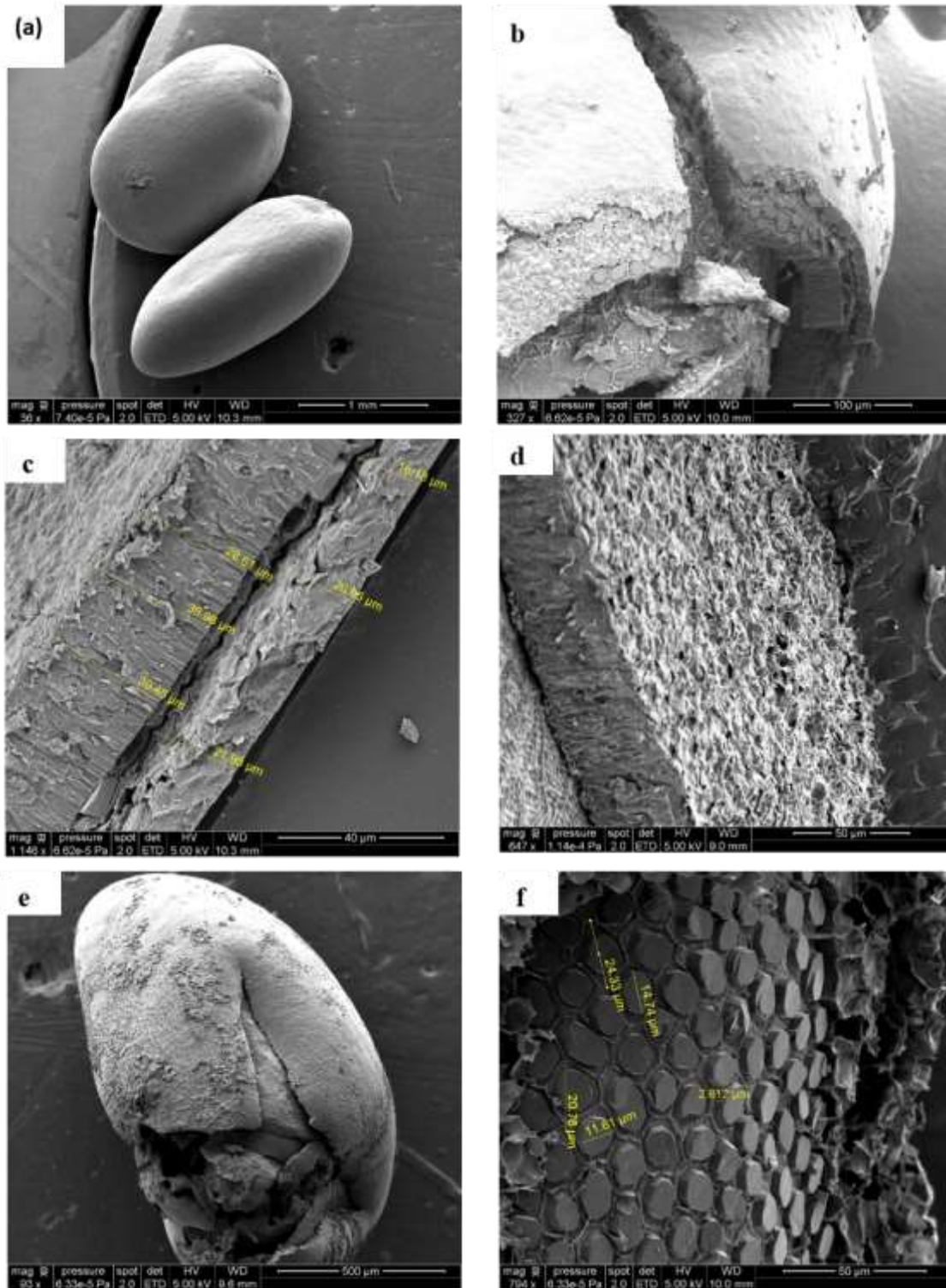


Figure III-3 : Observation des graines de chia au microscope électronique

(a) Graine entière, (b) vue d'une fracture de la graine entière, (c) vue des cellules du péricarpe, (d) graine hydratée, (e) et (f) graine démucilaginée.

c. Extraction du mucilage par cavitation ultrasonore en voie humide

Le Laboratoire de Chimie Agroindustrielle s'intéresse depuis toujours à la valorisation des graines oléoprotéagineuses. Ainsi un procédé de démulcination des graines à mucilage a été développé. Les premiers travaux ont été réalisés sur la graine de lin. Ces études ont permis de réaliser l'extraction privilégiée des composés surfaciques de la graine par cavitation ultrasonore (6,173). La colonne à ultrasons a ainsi été conçue pour cette application, l'extraction pouvant être réalisée en continue, en mode batch ou en recirculation.

Dans le cas du lin (variété marquise), trois méthodes d'extraction ont été testées afin de déterminer le rendement d'extraction du mucilage des graines de lin (Tableau III-2).

Tableau III-2 : Rendement d'extraction du mucilage de chia en fonction de la méthode d'agitation

Echantillons	Rendement (%)
Rayneri (ultraturrax)	4,32±0,00
Sonde US	10,23±0,02
Colonne US	11,14±0,00

Le rendement d'extraction du mucilage de lin par agitation mécanique est de 4,32%. Il est deux fois inférieur au rendement obtenu à l'aide d'une sonde (10,23%) et d'une colonne (11,14%).

Plus récemment, les travaux ont été menés sur la graine de cameline. La température, le couple d'agitation, le pH, la conductivité et l'indice de réfraction ont été suivis au cours de l'extraction. Cette étude a permis d'évaluer la composition du mucilage au cours de l'extraction en fonction des paramètres étudiés. Sur la base des travaux réalisés sur le lin et la cameline, l'extraction du mucilage de chia de la variété Oruro[®] est étudiée.

d. Suivi du couple moteur et de la température au cours de l'extraction du mucilage de chia Oruro[®]

L'évolution du couple moteur et de la température au cours de l'extraction du mucilage a été enregistrée. L'évolution du couple peut être considérée comme linéairement liée à l'évolution de la viscosité, à surface de contact et gradient constants. En effet, la viscosité s'exprime comme le ratio de la contrainte imposée (Force/Surface en N.m⁻²) sur le gradient de cisaillement (s⁻¹).

$$\tau = \mu \times E$$

Où τ : contrainte de cisaillement ; μ : viscosité dynamique ; E : gradient de cisaillement

Les ultrasons sont appliqués dès le début de l'extraction. Le logiciel de communication Comtools v2.4.4.0 permet de traiter les données obtenues. Dans les deux cas, il y a une augmentation du couple moteur pendant les 6 premières minutes de traitement ultrasonore (Figure III-4 et Figure III-5). Cela correspondrait à l'augmentation de la viscosité due au déploiement du mucilage et à son extraction par les bulles de cavitation. Par la suite il y a une diminution du couple et donc de la viscosité du milieu. Ce qui pourrait s'expliquer par l'action cisailante des ultrasons s'exerçant sur le mucilage déjà extrait. Après 20 min de traitement, le couple diminue de façon plus linéaire. L'augmentation de la température due aux ultrasons se fait de façon continue et atteint 50°C à 20 min (Figure III-4) et 63 °C au bout de 50 min (Figure III-5). Le mucilage obtenu après 20 min sera nommé Muc-030-20 et celui obtenu au bout de 50 min Muc-017-50.

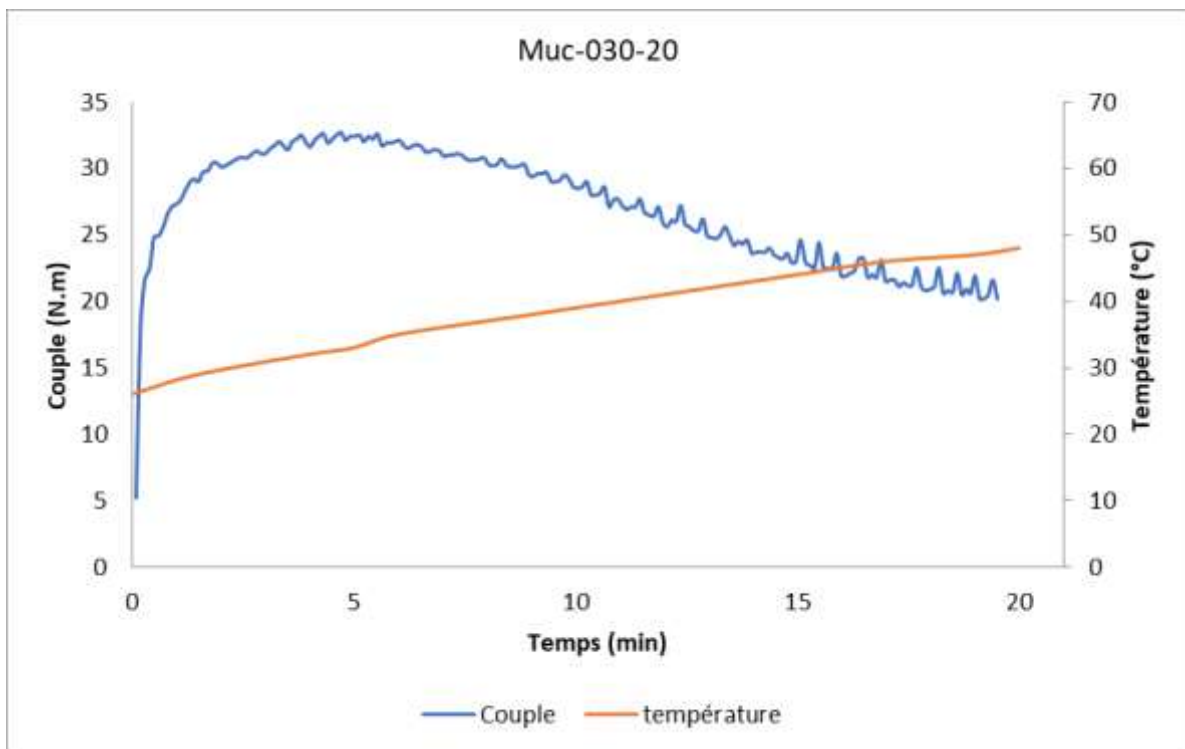


Figure III-4: Evolution du couple et de la température au cours du temps lors de la démucilagination de Muc-030-20

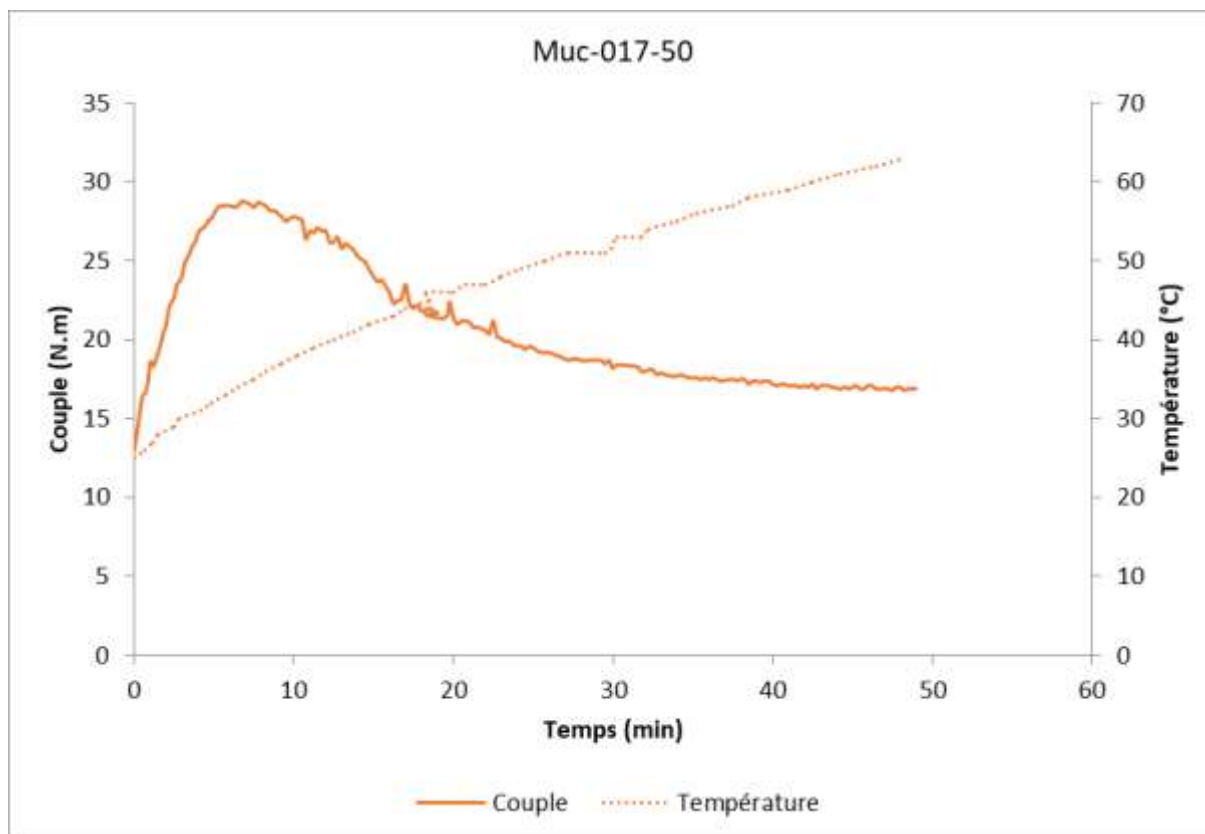


Figure III-5 : Evolution du couple et de la température au cours du temps lors de la démucilagination de Muc-017-50

e. Rendement d'extraction

L'extraction du mucilage a été réalisée dans une colonne à ultrasons en utilisant une amplitude de 100 % et une pulsation 5s on/20s off. Le rendement d'extraction est fonction de la durée de traitement. La durée de traitement est de 20 min pour l'essai (Muc-030-20) et 50 min pour l'essai (Muc-017-50). Pour 155 g de graines entières traitées, on obtient $3,88 \pm 0,1\%$ et $5,21 \pm 0,7\%$ de mucilage après lyophilisation, respectivement pour Muc-030-20 et Muc-017-50. Après lyophilisation, on récupère une masse de mucilage légèrement plus importante que le rendement massique à cause d'un résidu d'eau encore présent.

III.1.3. Caractérisation physico-chimique du mucilage

a. Teneur en cendres déterminée par calcination

La teneur en cendres de Muc-030-20 est de $7,35 \pm 0,04\%$ et la teneur en cendres de Muc-017-50 est de $9,07 \pm 0,02\%$. La teneur en cendres est une caractéristique fondamentale pour un

aliment. Elle est une valeur indicative de la teneur en minéraux. Il semble que la plus grande partie de la teneur en cendres est extraite durant les temps les plus courts. En effet, pour Muc-017-50, seulement 2% supplémentaire de cendres sont extraits après 30 min en plus de traitement ultrasonore. Ces observations ont été faites pour l'extraction du mucilage de caméline où le taux en cendres le plus élevé a été obtenu pour des courtes durées de traitement ultrasonore (174).

b. Taux de protéines déterminé selon la méthode par dosage Kjeldahl

Le taux de protéines obtenu pour les différentes expériences montre que la teneur en protéines est supérieure pour le mucilage obtenu après 50 min d'extraction soit $5,51 \pm 0,05\%$ contre $2,84 \pm 0,04\%$ à 20 min. Le taux de protéines est pratiquement le double après 50 min de traitement ultrasonore. Pour un traitement ultrasonore plus long, on a un rendement d'extraction élevé mais également une teneur en protéines plus importante. L'extraction des protéines est donc favorisée avec la durée de traitement.

c. Composition en acides aminés

Les résultats sur la composition en acides aminés des deux essais d'extraction sont regroupés sur la Figure III-6. Pour le mucilage extrait après 20 min de traitement, les acides aminés majoritaires sont la glycine, l'acide aspartique, la sérine, l'alanine et la thréonine. A 50 min de traitement ultrasonore, les acides aminés majoritaires sont la glycine, la proline, l'arginine, l'acide aspartique, la leucine, la valine. Dans les deux cas d'études, on obtient une teneur similaire en acide glutamique. Ces résultats montrent que la composition est variable en fonction du temps d'extraction. Si l'on compare avec les graines de caméline, on remarque d'une part que l'acide glutamique est majoritaire pour des temps d'extraction plus longs et d'autre part que les teneurs en acide aspartique sont proches comme c'est le cas pour la chia.

Les taux de protéines des mucilages obtenus à différents temps d'extraction représentent moins de 10% de la composition totale du mucilage.

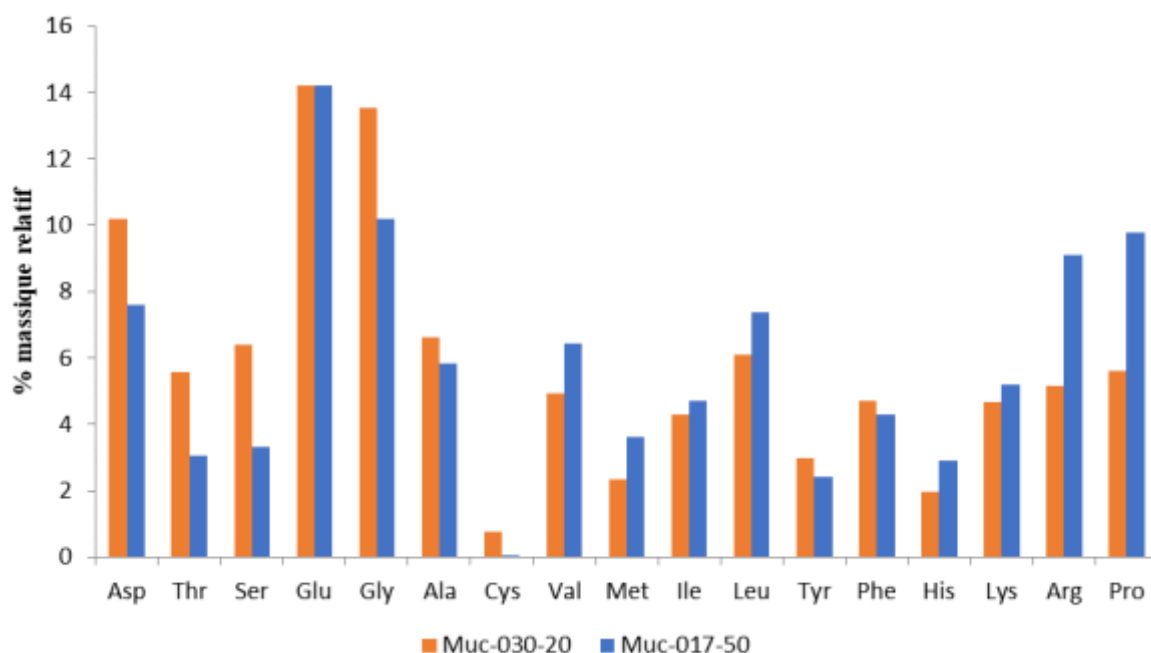


Figure III-6 : Composition en acides aminés du mucilage en fonction du temps d'extraction à 20 min (essai Muc-030-20) et 50 min (essai Muc-017-50)

d. Composition en monosaccharides déterminée selon la méthode de Blumenkrantz

Cette méthode consiste à quantifier les acides uroniques par dosage en équivalents « acide galacturonique ». Les résultats des analyses des acides uroniques ont donné des teneurs de 47,4% et 30,3% respectivement pour Muc-0130-20 et Muc-017-50. A partir de la composition du mucilage obtenu, on en déduit par différence de la quantité des protéines et des cendres la teneur en sucre. Ainsi, Muc-030-20 est composé de 90% de carbohydrates dont 51% représentent les acides uroniques et 49% les monosaccharides neutres. Muc-017-50 a une teneur en polysaccharides totale de 85% dont 35% sont les acides uroniques et 65% représentent les monosaccharides neutres.

La Figure III-7 présente la composition relative en monosaccharides des mucilages de chia obtenue après 20 min et 50 min d'extraction. Différents temps d'hydrolyse du mucilage à 15, 30, 60 et 120 min ont été réalisés. Les résultats présentés sont ceux obtenus pour chaque monosaccharide à sa plus forte concentration après hydrolyse. A ces temps, Muc-030-20 est hydrolysé à 32% de la masse initiale pendant que Muc-017-50 l'est à 36%. Pour ce dernier, un échantillon a été prolongé à 240 min et l'hydrolyse est à 51%. Le mucilage ayant subi un temps de traitement ultrasonore plus long a une résistance à l'hydrolyse moins importante que Muc-

030-20. Cela peut s'expliquer par le fait que Muc-030-20 possède des chaînes polysaccharidiques plus longues que Muc-017-50 du fait de sa courte exposition aux ultrasons.

Le mucilage obtenu à 20 min présente six monosaccharides neutres dont les majoritaires sont le xylose (17,28%) et le glucose (9,12%) dans un ratio approximatif de l'ordre de 2:1. Le mucilage obtenu après 50 min de traitement présente une quantité en mannose (14,73 %) plus importante. On retrouve un ratio approximatif mannose (14,73 %):glucose (5,47 %) de l'ordre de 3:1. Cette étude a permis de détecter la présence de fucose, et de fructose en plus. Nous dénombrons huit monosaccharides dans la graine de chia Oruro® dont le fucose et le fructose en plus par rapport aux résultats de Timilsena *et al.* (44) et de Hernandez *et al.* (46) enregistrés sur les graines de chia d'Australie et d'Argentine.

L'étude montre que plus le temps d'extraction est long, plus la teneur en acide uronique est faible et la composition en monosaccharides neutres élevée. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'au cours de l'extraction du mucilage, les acides uroniques seraient les premiers à être extraits et les sucres neutres sont extraits à la suite (6). En effet, le suivi du pH au cours de l'extraction du mucilage de cameline et de lin a montré une chute rapide de celui-ci lors de l'hydratation des graines. Il y aurait donc une augmentation d'espèces acides organiques dans le milieu notamment, les acides uroniques lesquels, seraient majoritairement présents dans Muc-030-20.

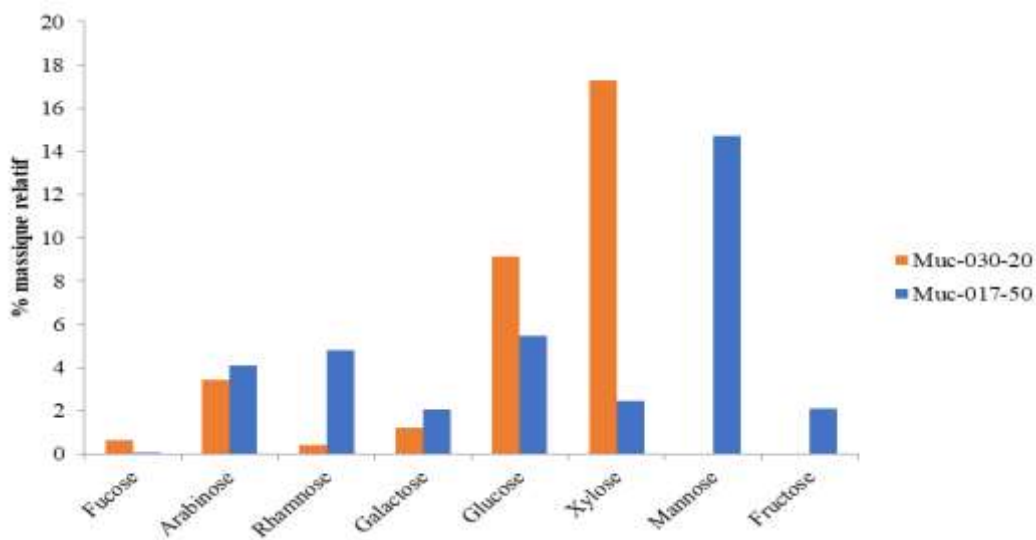


Figure III-7 : Composition en monosaccharides du mucilage en fonction du temps d'extraction

a. Viscosité intrinsèque déterminée selon les méthodes de Kreamer, Huggins et Solomon

Les mesures de viscosités cinématiques ont été réalisées sur des solutions de mucilage de concentrations allant de 0,01 % à 0,1 % en masse. Les viscosités de Kreamer et de Huggins sont calculées. A partir des valeurs obtenues, les courbes de viscosité en fonction de la concentration massique en mucilage sont tracées (Figure III-8). Les viscosités intrinsèques des solutions de mucilages pour les différentes méthodes de calcul sont données dans le Tableau III-3.

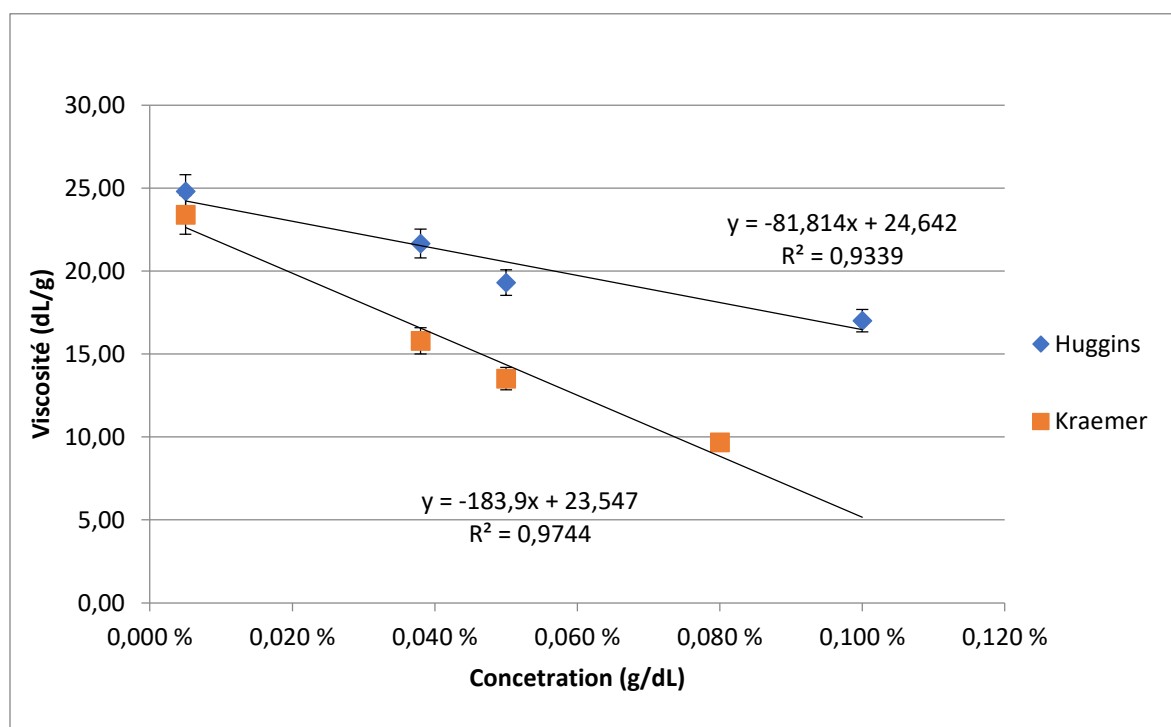


Figure III-8 : Représentation de Kreamer et Huggins pour la détermination de la viscosité intrinsèque de Muc-017-50

Tableau III-3: Viscosités intrinsèques des mucilages extraits à différents temps

	Kraemer	Huggins	Solomon	Viscosité intrinsèque (dL/g)
Muc-030-20	32,37	41,43	34,75	36,18±4,70
Muc-017-50	23,54	24,64	23,85	24,01±0,42

Les résultats de viscosité intrinsèque des mucilages montrent que pour un temps plus long des ultrasons, la viscosité intrinsèque est plus faible, soit $23,76 \pm 0,55$ % contre $36,18 \pm 4,70$ % pour un temps plus court. Cela peut s'expliquer par l'effet d'hydrolyse au cours du temps du mucilage déjà extrait par les ultrasons. En effet, la viscosité intrinsèque représente la variation relative de la viscosité d'une solution par unité de concentration d'un polymère à dilution infinie. Elle est directement liée à la nature des polymères. La loi de Mark-Houwink permet d'établir la relation entre la masse molaire et la viscosité :

$$[\eta] = K.M^\alpha$$

Où K et α représentent des constantes caractéristiques du couple polymère-solvant à une température donnée et M la masse molaire moyenne du polymère.

Ainsi, un traitement ultrasonore prolongé permet d'augmenter le rendement d'extraction de polysaccharides et donc la viscosité du milieu. Cependant, les polysaccharides extraits sont soit partiellement hydrolysés avec les ultrasons ou sont d'une nature différente (plus courtes chaînes) d'où une viscosité plus faible.

b. Poids moléculaire

Le profil du poids moléculaire du mucilage obtenu par chromatographie par perméation de gel donne des valeurs de masse molaire moyenne en masse de 1344 ± 18 kDa environ pour un indice de polydispersité moyen de 2,26. Le mucilage obtenu par filtration du milieu réactionnel puis lyophilisation a une masse molaire moyenne proche du mucilage obtenu après lyophilisation puis séparation par tamisage du mucilage restant autour des graines. Pour ce dernier, une masse molaire de 1303 ± 16 kDa et un indice de polydispersité ont été obtenus.

c. Analyse thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique du mucilage montre une perte de masse de 28,0 à 227,5°C correspondant à la température de décomposition thermique du mucilage (Figure III-9). De 28 à 150°C, on a une perte en masse de 14,1% et de 150 à 500 °C on a une perte en masse de 68,38%. L'étude réalisée par Hernandez sur le mucilage des graines de chia produite en Argentine a rapporté une température de décomposition du mucilage à 271,2°C (46).

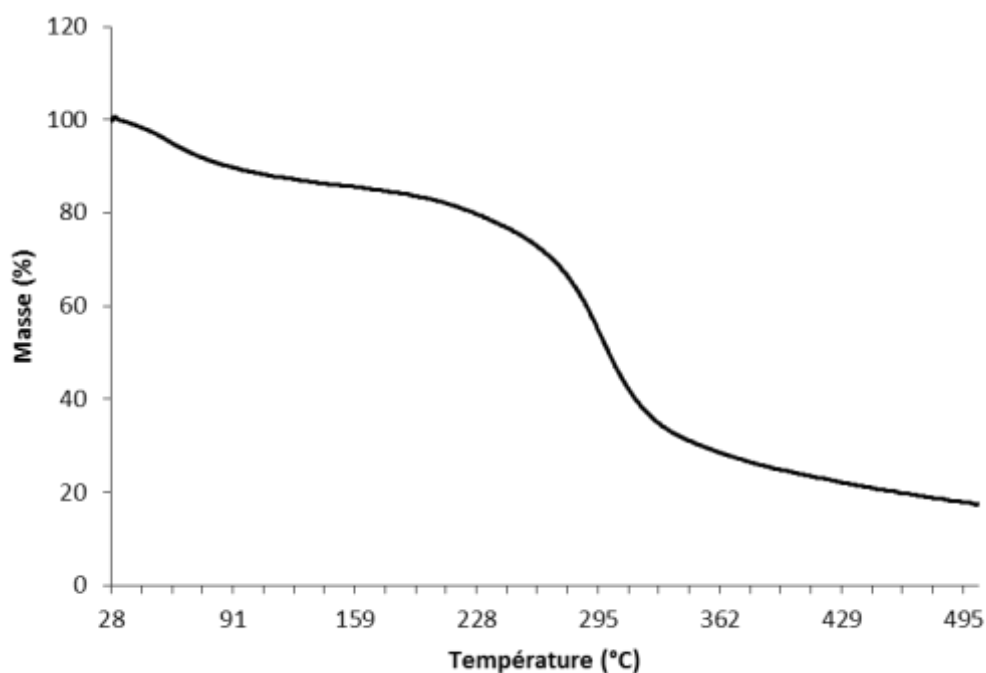


Figure III-9 : Thermogramme du mucilage de l'essai Muc-017-50 des graines chia Oruro®

Bilan sur l'extraction du mucilage

Les résultats obtenus montrent que la graine de chia est une source importante d'huile et de protéines mais aussi de mucilage localisé à sa surface. Le mucilage de chia est composé de deux principaux biopolymères : les protéines et les polysaccharides. Deux principaux types d'essais ont fait l'objet des études d'extraction de mucilage dans une colonne à ultrasons conçue pour cette application. Les rendements obtenus sont de 3,88 % pour l'essai type à 20 min (Muc-030-20) et de 5,21 % pour l'essai type à 50 min (Muc-017-50). La composition en polysaccharides acides et neutres du mucilage varie avec le temps de traitement. Les résultats ont montré qu'au cours de l'extraction, la viscosité du milieu augmente dès le début du traitement. Cependant, l'action cisailante des ultrasons dans le temps conduit à la diminution de la viscosité. Fondamentalement, la viscosité dépend de l'extraction du mucilage en début de traitement. Les acides uroniques du mucilage sont extraits en premier.

La composition du mucilage est aussi liée à la durée de traitement ultrasonore. Il est ainsi possible d'obtenir un mucilage contenant moins de protéines à des courtes durées d'extraction et plus à une plus longue durée. Il en résulte l'extraction des peptides constitués principalement

d'acides aminés essentiels : thréonine, valine, méthionine, isoleucine, leucine, tryptophane, tyrosine, phénylalanine, lysine, histidine.

La teneur en cendres, qui est une valeur approximative de la teneur en minéraux, montre que ces derniers sont extraits majoritairement en début de traitement. Le taux de minéraux est de 7,35% pour Muc-030-20 et de 9,07% pour Muc-017-50.

La présence de ces sucres neutres et acides d'une part et celle des acides aminés essentiels d'autre part signent ici des marqueurs chimiques et biologiques du mucilage de chia. La stabilité thermique du mucilage assurerait les applications du mucilage à des températures élevées sans risque de décomposition de ce dernier. Le mucilage de chia peut être utilisé dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques à cause de sa composition en protéines, polysaccharides et minéraux et de ses propriétés. Il peut être utilisé en tant qu'agents épaississant, stabilisant et texturant. Il peut par ailleurs constituer une source de fibres et de protéines en tant que complément alimentaire. La présence d'un grand nombre de fonctions hydroxyles et d'acides carboxyliques dans les sucres neutres et acides des monosaccharides dans le mucilage permet d'envisager son utilisation dans l'industrie de la sucrochimie pour l'obtention de produits tels que les esters de sucre.

III.2. *Irvingia gabonensis*

La Figure III-10 présente le schéma de pressage des graines de *I. gabonensis*. L'intérêt du pressage est d'éviter l'utilisation de solvant pour l'extraction du beurre. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des graines, à la méthode de pressage de l'amande de *I. gabonensis* en beurre et à sa caractérisation.

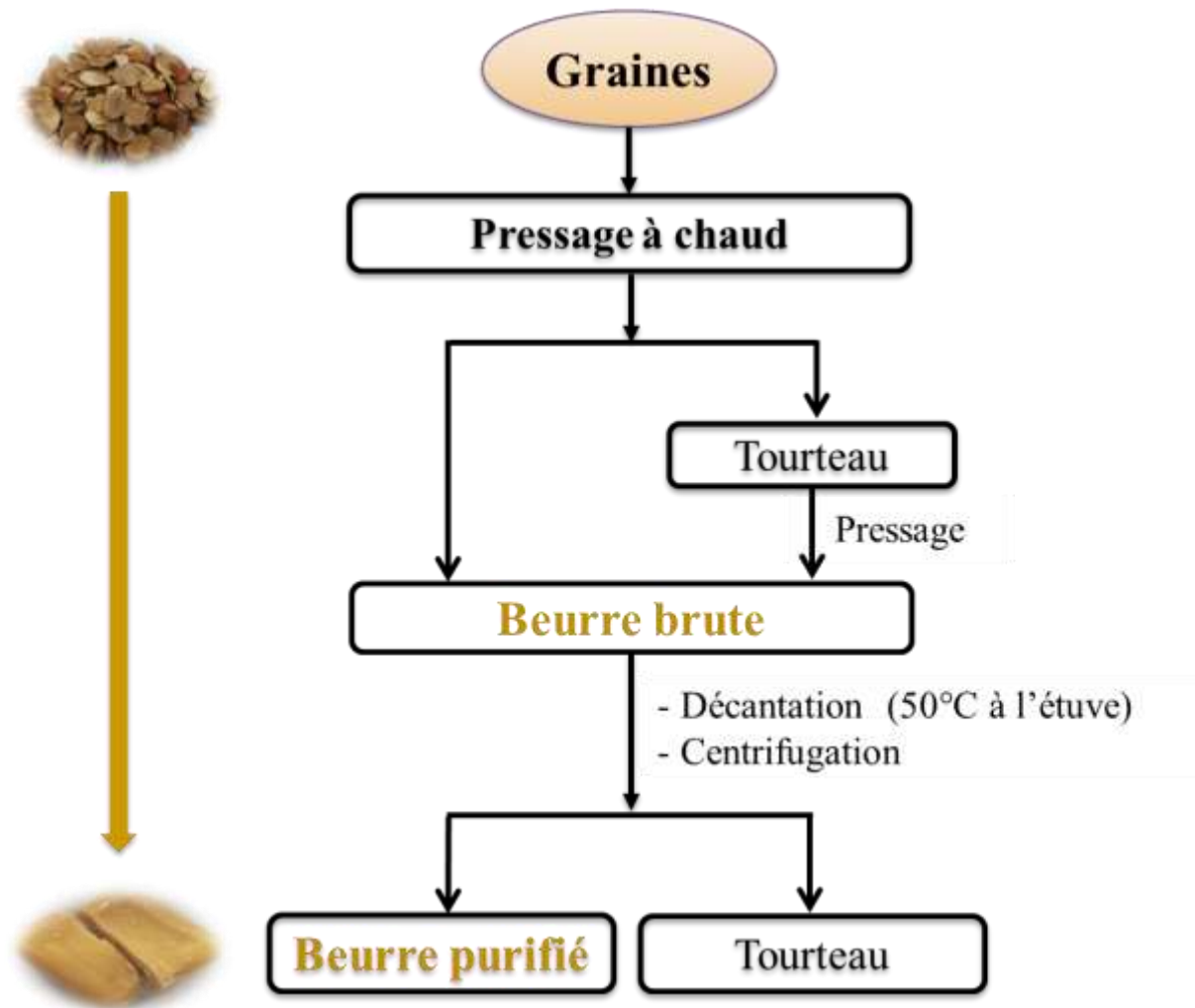


Figure III-10 : Schéma du pressage des amandes de *I. gabonensis*

III.2.1. Caractérisation de la graine

a. Observation microscopique au Cryo-MEB

Les images obtenues par observation au cryo-MEB des amandes de *I.gabonensis* permettent de déceler les corps lipidiques pouvant correspondre aux oléosomes (Figure III-11). Les figures III-11-a et III-11-b montrent une vue d'ensemble de la fracture de l'amande. Cette dernière serait majoritairement composée d'oléosomes. Les figures III-11-c et III-11-d présentent l'agrandissement de ces cellules. Selon les données bibliographiques, l'amande est composée de beurre à plus de 60 % (63,67,70,76,175,176). Cela laisse penser que les fragments observés sont les oléosomes. Ces corps lipidiques présentent des tailles comprises entre 30 et 60 μm .

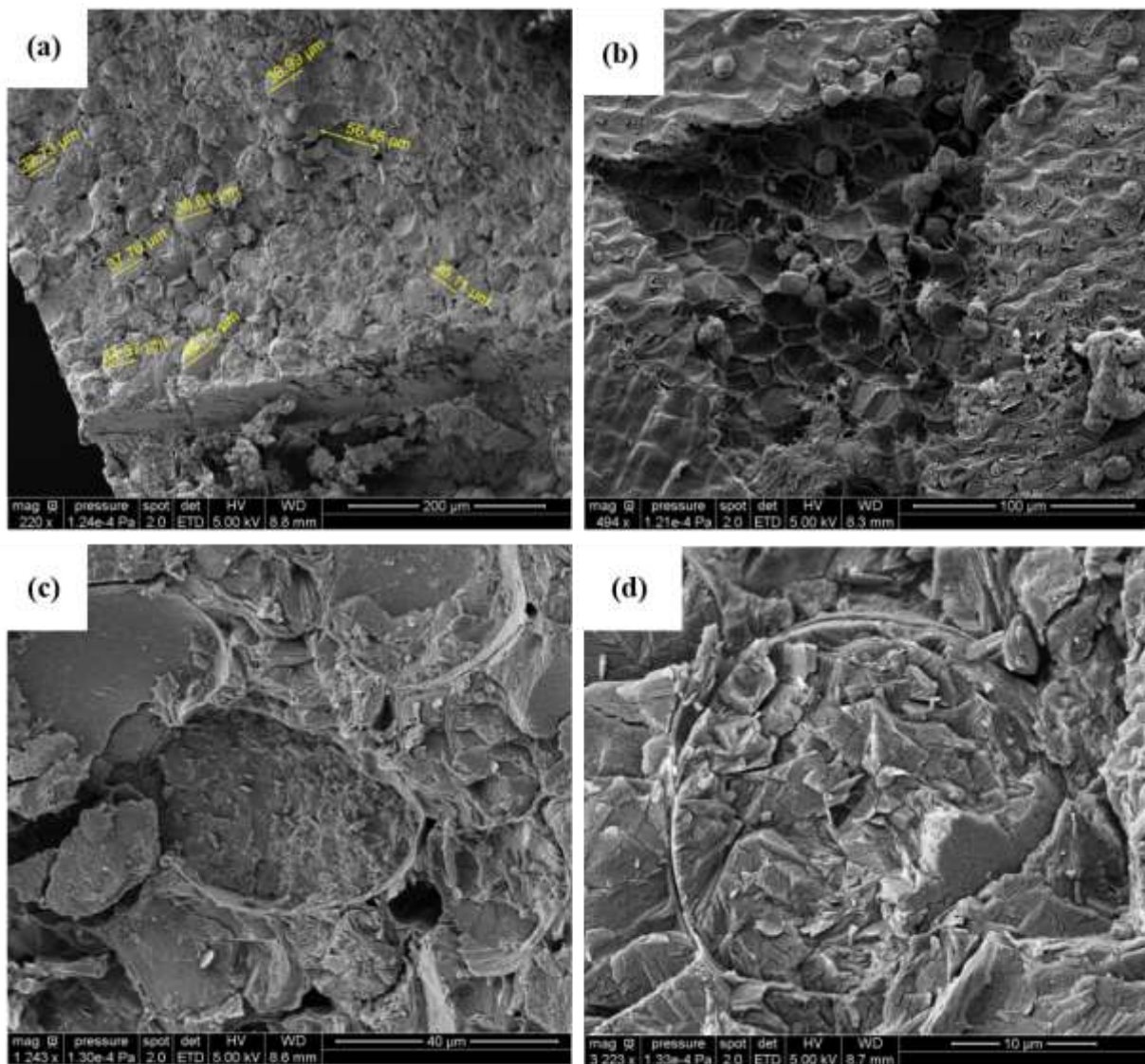


Figure III-11 : Observation des cellules de la graine de *I. gabonensis*

b. Caractérisation physico-chimique

Selon la méthode d'extraction par soxhlet et les analyses par la méthode de Kjeldahl, la calcination et séchage thermique, l'amande de *I. gabonensis* est composée de $63,8\pm 0,2\%$ de matière grasse, $19,9\pm 0,1\%$ de carbohydrates, $13,0\pm 0,2\%$ de protéines, $2,3\pm 0,0\%$ de cendres et $1,1\pm 0,0\%$ d'humidité. En ce qui concerne la matière grasse, ces résultats sont en accord avec ceux des travaux rapportés dans la littérature dont les teneurs en matière grasse sont comprises entre 34,3 et 75,5% (63,67,70,76,175,176). La teneur en matière grasse dans les amandes de ces variétés est supérieure à celle des amandes des fruits des plantes oléagineuses tropicales comme le cacao (50,0-52,0%), moabi (50,5%) (177).

c. Profil des acides aminés de l'amande de *I. gabonensis*

Les résultats du profil des acides aminés (Tableau III-4) montrent que l'amande de *I. gabonensis* est une source d'acide glutamique (19,93%), d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,05%). C'est également une bonne source d'acides aminés essentiels : la leucine (8,54%), la valine (5,24%) l'isoleucine (5,20%) et la lysine (5,10%). Les autres acides aminés ont des valeurs comprises entre 1,89% et 5,45%. La leucine intervient dans la régulation des niveaux de glycémie et la stimulation de l'hormone de croissance. La valine permet la régénération et la croissance musculaire ; l'isoleucine et la lysine interviennent dans la santé musculaire et l'arginine est indispensable chez les nourrissons et l'enfant.

Tableau III-4 : Composition relative en acides aminés des amandes de *I. gabonensis*

Acides aminés	% massique relatif
Acide aspartique	10,05±0,33
Thréonine	3,93±0,12
Sérine	5,45±0,01
Acide glutamique	19,93±1,02
Glycine	5,20±0,01
Alanine	4,72±0,15
Cystéine	1,89±0,26
Valine	5,24±0,08
Méthionine	2,70±1,63
Isoleucine	5,20±0,53
Leucine	8,54±0,75
Tyrosine	2,58±0,24
Phénylalanine	3,54±0,33
Lysine	5,10±0,12
Histidine	2,52±0,24
Proline	4,40±0,41
Arginine	9,05±0,54
Tryptophane	ND

ND : Non déterminé

III.2.2. Pressage et caractérisation du beurre

a. Rendement d'extraction par pressage

Le beurre étant solide à température ambiante, il est nécessaire de chauffer les pièces métalliques de la presse. Le pressage est réalisé en faisant varier les paramètres de la presse. Les meilleures conditions opératoires sont étudiées en utilisant un orifice de la vis de 7 mm et un tour de vis de 1 mm. Les résultats obtenus montrent que le rendement de pressage à chaud est de 45,7%. Ce qui représente 71,7 % de la teneur en beurre total de l'amande. Cependant, le pressage est difficile car il se forme une pâte autour de la vis. Le procédé est optimisé en faisant varier l'orifice de la vis à 7 mm. On effectue le cycle de pressage des amandes suivi de celui du

tourteau. Cette procédure donne un rendement de 48,0%, soit 75,3 % de la teneur en beurre totale de l'amande. Pour un tour de vis de 0,5 cm et un orifice de 8 mm on obtient un rendement de 41,3% pour le pressage des amandes suivi de celui du tourteau (Tableau III-5). La technique de pressage à chaud par la presse Khomet utilisée dans cette étude s'affranchit du verrou provoqué par le figeage du beurre. Il est adapté pour épuiser suffisamment la matière grasse résiduelle dans le tourteau par l'apport thermique. Le traitement au solvant n'est pas nécessaire. Il s'avère que les cycles de pressage d'amandes suivi de cycle de pressage de tourteau gras augure de procéder de façon semi-continue et efficiente à l'obtention quantitative de beurre avec un rendement élevé de 48,0% soit une teneur de 75,3% en beurre. Il est directement utilisable dans les applications domestiques, de transformation, de formulations. Il est possible d'envisager d'équiper une plateforme technologique de cet équipement pour produire des beurres végétaux fonctionnels. Cette méthode de pressage des amandes de *I. gabonensis* permet d'augmenter les rendements d'extraction de beurre comparée aux méthodes de pressage décrites dans la littérature par Matos et *al.* (67) et Ogunsina et *al.* (75). En effet, Matos et *al.*, ont obtenu un rendement d'extraction de 34,5% par cuisson puis pressage (67) et Ogunsina et *al.* (75) ont obtenu un rendement d'extraction de 36,6% par pressage à chaud (Tableau III-6). Dans notre étude, que le pressage soit réalisé pour un cycle (45,7%) ou deux cycles (47,9%), le rendement d'extraction est meilleur.

Tableau III-5 : Rendements d'extraction en fonction de la méthode d'extraction des amandes de *I. gabonensis*

	Pressage amandes	1 ^{er} cycle : pressage amandes 2 ^{ème} cycle : pressage tourteau	1 ^{er} cycle : pressage amandes 2 ^{ème} cycle : pressage tourteau
Orifice (mm)	6	7	8
Tour (cm)	1	1	1/2
Rendement (%)	45,7	47,9	41,3

Tableau III-6 : Rendements d'extraction du beurre de *I. gabonensis* en fonction de la méthode d'extraction

Techniques d'extraction	Présente étude	Ogunsina et <i>al.</i> 2014 (75)	Matos et <i>al.</i> 2009 (67)
Soxhlet	63,8		62,7
Pressage	47,9	36,6	34,3

b. Détermination des indices normés du beurre de *I. gabonensis*

L'indice d'acide (IA) et le pourcentage en acides gras libres (AGL) sont liés et constituent un indicateur de la qualité de la matière grasse. Une valeur d'indice d'acide faible induit un taux d'acides gras libres faible ce qui correspond à une meilleure qualité de l'huile. L'IA et la teneur en AGL sont respectivement de $6,4 \pm 0,3$ mg KOH/g et de 2,3%. C'est un beurre de bonne qualité à cause sa teneur en acide gras libres inférieure à 10%. L'indice de saponification du beurre obtenu est de $225,9 \pm 0,2$ mg KOH/g. Les valeurs affichées dans les études antérieures concernant l'amande de *I. gabonensis* sont comprises entre 189 et 256 mg KOH/g (66,67,76). L'indice de saponification élevé de ce beurre suggère qu'il peut être utilisé pour la fabrication des savons métalliques utilisables dans des applications industrielles. Ces résultats suggèrent que le beurre de la mangue sauvage est utile pour des applications domestiques et industrielles.

c. Détermination du profil glycérique du beurre de *I. gabonensis* par une analyse statistique

Les résultats obtenus concernant le profil glycérique montrent que le beurre est constitué à 98,4% de triglycérides. Par une analyse statistique s'appuyant sur la composition en acides gras, on a pu établir les triglycérides prépondérants présents dans le beurre d'*I. gabonensis*. Ainsi, les triglycérides majoritaires seraient respectivement MLM, LML, MMM, MLP et LLL pour des teneurs massiques respectives de 31,0%, 23,0%, 13,9%, 6,3% et 5,7%. Les teneurs massiques entre 5 et 1%, sont attribuées à MPM, LPL, MLO, MLD (Figure III-12). D, L, M, P et O représente respectivement les acides dodécanoïque, laurique, myristique, palmitique et oléique. Les résultats de cette étude statistique peuvent être comparés aux résultats d'analyse rapportés par Yamoneka et *al.* (70) et Silou et *al.* (69) qui ont rapporté un ordre de prépondérance MLM, LML, MMM, LLL. Le profil en triacylglycérides du beurre d'*I. gabonensis* permet de le classer comme une graisse peu complexe (177).

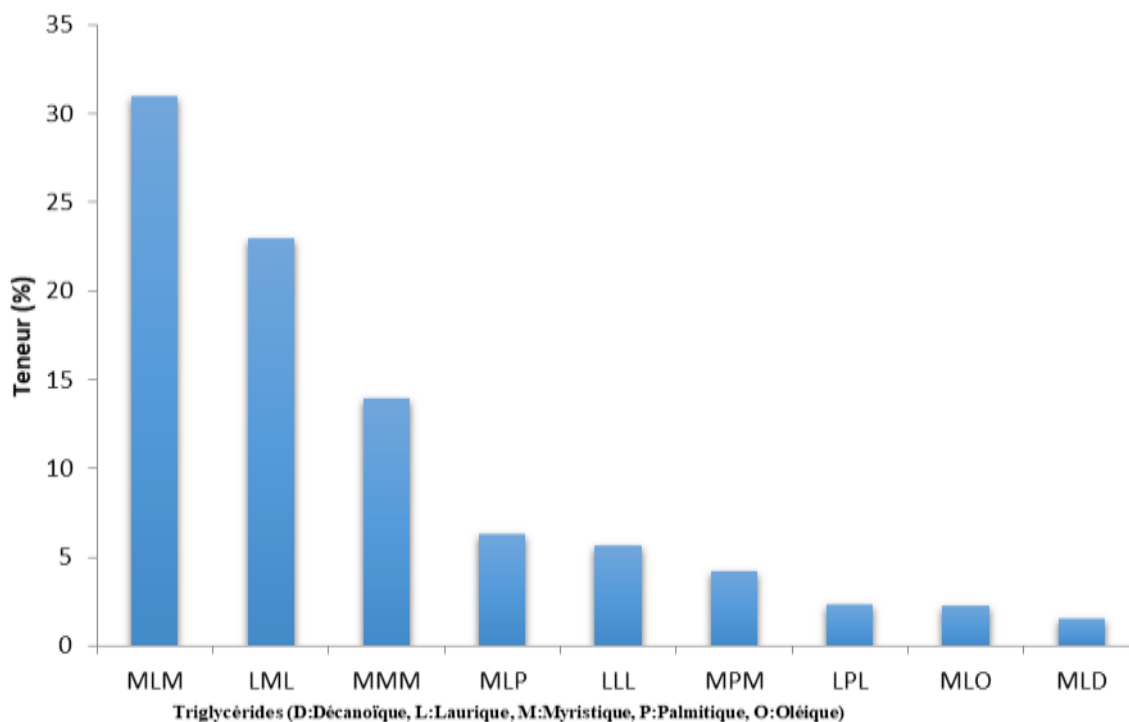


Figure III-12 : Résultats statistiques de la composition en triglycérides

d. DSC/SFC (solid fat content) du beurre de *I. gabonensis*

L'analyse par calorimétrie différentielle à balayage du beurre de *I. gabonensis* a révélé un pic unique à 44,1°C (Figure III-13). Cette température correspond à la température de fusion du beurre de *I. gabonensis*. Cette température élevée peut s'expliquer par la composition du beurre en triglycérides riches en acides myristique et laurique dont les températures de fusion sont respectivement 58°C et 43°C.

La fusion du beurre commence à 15°C et est totale à 50°C. Ce qui explique sa solidité à température ambiante. Le beurre pourrait ainsi être utilisé comme agent structurant dans la fabrication des beurres alimentaires sans recours à l'hydrogénation (178) et aussi dans la formulation des produits cosmétiques ou pharmaceutiques tels que les suppositoires.

Ces résultats se rapprochent de ceux rapportés dans les travaux antérieurs de Yamoneka et al. (70) qui ont obtenu une température de fusion de 39°C (70) et ceux de Silou et al. (69) qui ont obtenu des valeurs comprises entre 40 et 43°C en fonction de l'origine de la graine (67,69,179). Ces températures sont supérieures à celles obtenues par Yamoneka et al. (180) pour *I. gabonensis* (fusion complète à 40°C) et par Sonwai et al. (179) pour *Irvingia malayana* (fusion complète à 35°C) dont les teneurs en SFC ont été déterminées par RMN.

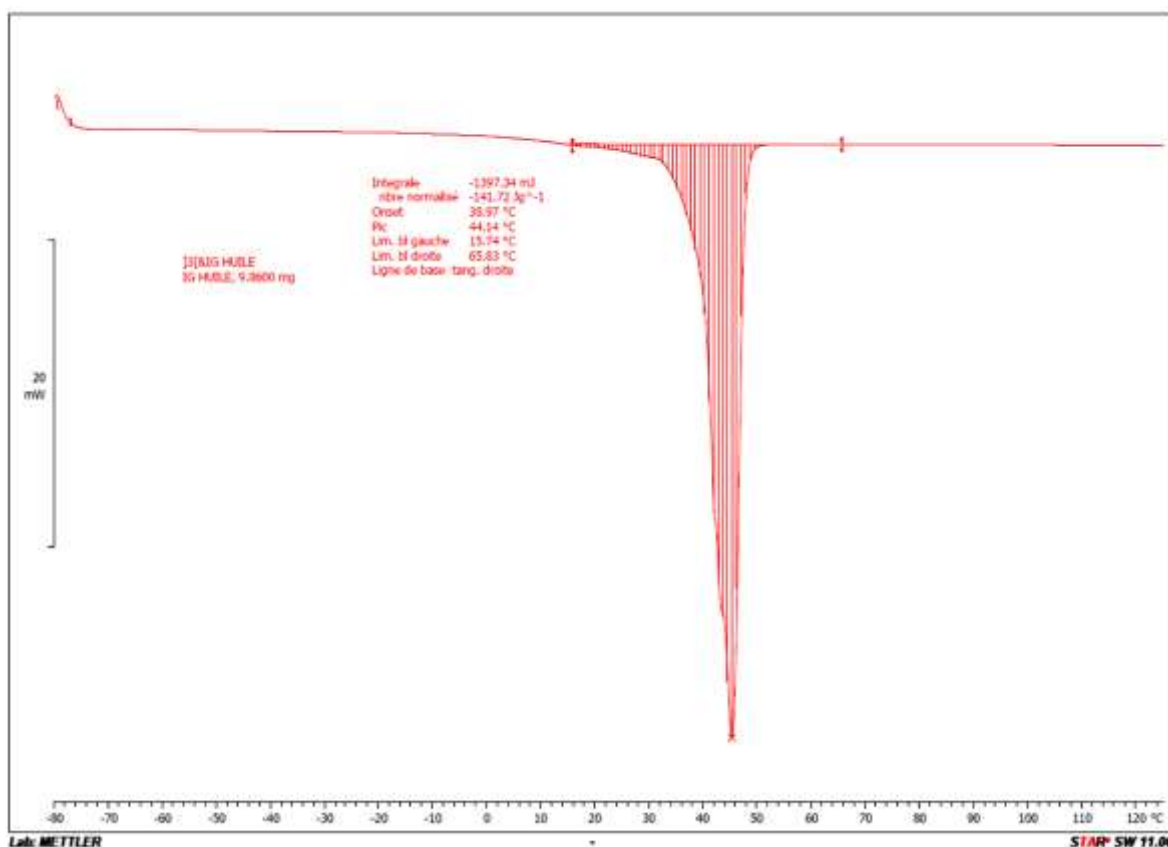


Figure III-13 : Courbe de fusion du beurre obtenue par DSC

e. L'analyse thermogravimétrique du beurre de *I. gabonensis*

L'analyse thermogravimétrique est une méthode simple et adaptée pour étudier le schéma de décomposition d'un échantillon. La Figure III-14 montre les résultats de l'analyse thermogravimétrique réalisée sur le beurre de *I. gabonensis*. La perte en masse de l'échantillon est totale (100%) à une température de 415,2°C. Cette température élevée révèle que le beurre de *I. gabonensis* est très stable et conviendrait pour des utilisations en tant que beurre de friture stable ou utilisable dans les applications de cuisson à température élevée. En considérant la consommation des huiles lauriques (palmiste et coprah) en Europe en 1996, la consommation en Allemagne était de 340 000T (33%) contre 520 000 T en Europe. Les besoins en huile laurique couvrent aussi bien des applications techniques grâce à leurs avantages : belle couleur, bonne odeur, haute stabilité chimique sans risque aux réactions d'oxydation par l'absence presque des acides gras insaturés et polyinsaturés.

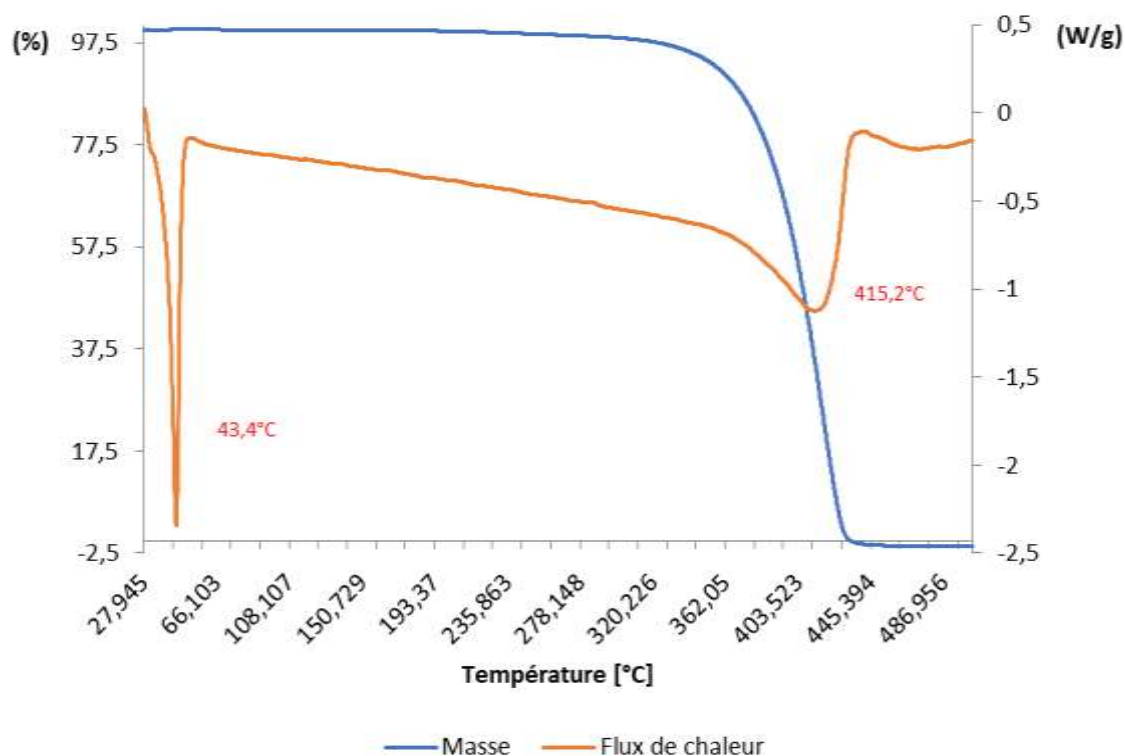


Figure III-14 : Thermogramme obtenu par ATG du beurre de *I. gabonensis*.

III.2.3. Hydrolyse enzymatique du beurre de *I. gabonensis*

a. Rendement d'hydrolyse des acides gras beurre de *I. gabonensis*

L'hydrolyse enzymatique du beurre de *I. gabonensis* a été réalisée en utilisant la lipase de *Candida rugosa* en milieu aqueux sous agitation ultraturrax à 500 rpm. L'agitation ultraturrax favorise l'activité interfaciale de l'enzyme par le cisaillement du milieu et la production de gouttelette de petite taille. Cette lipase a une activité catalytique supérieure ou égale à 2U correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire à la libération de 1 μmol d'acide oléique par minute à pH 8 et à 40°C.

Le beurre de *I. gabonensis* est composée de 98,4% de triglycérides. Selon la composition de ces triglycérides, l'utilisation de cette lipase est inappropriée en raison de l'absence de triglycérides riches en acide oléique. La question posée est la typosélectivité. Le suivi cinétique réalisé au cours de l'hydrolyse du beurre de *I. gabonensis* montre que la réaction est quasi totale au bout de 2 h de réaction (Figure III-15). 94,1% d'acides gras et 5,2% de monoglycérides ont été obtenus. Ces résultats montrent que cette enzyme réalise la rupture des esters de ces

triglycérides qualifiés de graisse peu complexe directement en acides gras avec la formation transitoire de monoglycérides. La lipase de *C. rugosa* convient à l'hydrolyse esters porteurs des acyles à courtes chaînes. La formation des monoglycérides semble bien montrer la localisation de la réaction à l'interface huile/eau et la catalyse de la réaction à cette interface.

La lipase *Candida rugosa* est une enzyme hydrosoluble qui s'active à l'interface eau/huile. La lipase de *Candida rugosa* a été utilisée dans le cadre de l'hydrolyse des huiles oléiques dans les huiles de colza, tournesol haut et très haut oléique (181,182), eicosanoïque dans le ramboutan (166,178). La lipase libère tous les types d'acides gras (183). C'est pour la première fois que nous utilisons avec succès la lipase de *C. rugosa* pour hydrolyser les huiles lauriques C12:0/C14:0 sans typosélectivité et avec efficacité (rendement=94,1%) et une durée de réaction courte de 2 heures. Qui plus est, la lipase est récupérée dans la phase aqueuse. Elle est recyclable.

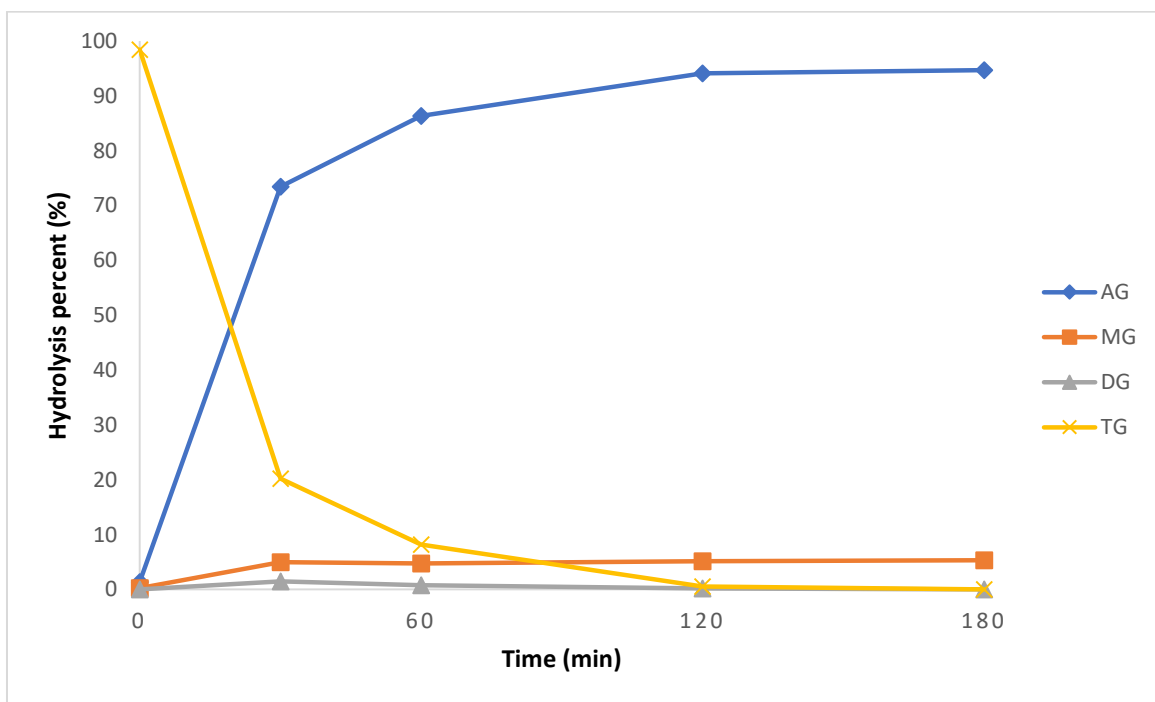


Figure III-15 : Suivi cinétique de l'hydrolyse du beurre de *I. gabonensis*

AG : acides gras ; MG : monoglycérides ; DG : diglycérides ; TG : triglycérides

b. Profil des acides gras du beurre de *I. gabonensis*

Les résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse (Tableau III-7) révèlent que le beurre est constitué de cinq acides gras saturés représentant 97,6 % des acides gras saturés totaux. Les acides myristique (C14:0) et laurique (C12:0) sont les plus abondants avec respectivement 51,9 % et 38,5 % pour une teneur totale en acides gras saturés de 90,4 %.

Tableau III-7 : Profil des acides gras du beurre de *I. gabonensis*

Acides gras	Longueur de chaîne de carbone	Teneur (%)
Caprique	C10 : 0	1,29±0,03
Laurique	C12 : 0	38,48±0,09
Myristique	C14 : 0	51,87±0,18
Palmitique	C16 : 0	5,25±0,01
Stéarique	C18 : 0	0,73±0,02
Oléique	C18 : n1-9	1,89±0,04
Linoléique	C18 : 2n-6	0,57±0,01
AGS		97,60±0,05
AGMI		1,89±0,04
AGPI		0,57±0,01

AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés.

La famille des *Irvingiaceae* représentée par ses différentes variétés constituent des sources importantes d'acides gras saturés riches en acides laurique et myristique. Dans le cas de cette étude, l'espèce *gabonensis* permet de fournir l'acide myristique à 51,87% de la teneur totale en acides gras. Cet acide gras est produit à 1,8 millions de tonnes soit 1,6% de la production parmi les acides gras principaux.

Le programme de développement dans lequel s'inscrit la domestication de cette famille dans plusieurs pays d'Afrique de l'ouest et centrale participera à l'augmentation de la production de son beurre. Ainsi la production des acides gras myristique et laurique pourra augmenter.

Le beurre peut être valorisé dans l'industrie agro-alimentaire pour maîtriser la texture des produits dans la fabrication des pâtes à tartiner. Il pourrait également être valorisé en détergence et savonnerie. *I. gabonensis* peut ainsi être utilisé comme substitut au beurre de cacao (180,184).

Le beurre de *I. gabonensis* rentre dans la catégorie des beurres riches en acides gras C12:0 et C14:0 avec le coprah (C12:0 à 44,75%). Dans cette catégorie de beurre laurique, *I. gabonensis* se distingue par sa richesse en C14:0 et C12:0 qui induit des propriétés physiques très intéressantes (T_f : 43°C, résistance thermique élevée). Dans le cas du coprah, en plus des beurres lauriques, on retrouve les beurres palmitiques dont un exemple est le cacao (C16:0 de 24-29% ; C18:0 de 32-37%). Il affiche une température de fusion comprise entre 26-35°C. On découvre aussi les beurres stéariques (C18:0 de 44,5%) dont les températures de fusion sont comprises entre 37 et 39°C. C'est le cas du beurre de illipé (Tableau III-8).

Les beurres lauriques à teneur élevée en acide myristique sont originaux. Ils doivent être insérés en haut de la chaîne de valeur des beurres végétaux tropicaux.

Tableau III-8 : Profil des acides gras de quelques beurres tropicaux

Acides gras	Mangue sauvage	Coprah (185)	Cacao	Illipé
C8:0		5,35		
C10:0	1,29	6,48		
C12:0	38,48	44,75	<0,1	
C14:0	51,87	20,10	<0,3	
C16:0	5,25	8,88	24-29	20,2
C18:0	0,7	3,16	32-37	44,5
C20:0			1-2	1,4
C18:1n-9	1,9	8,44	31-37	33,4
C18:2n-6	0,5	2,15	2-5	0,4
C18:3n-3			<0,3	0,1
AGS	97,60	88,72	57-68	66,1
AGMI	1,9	8,44	31-37	33,4
AGPI	0,57	2,15	2-5	0,5

AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés.

c. Caractérisation des acides gras solides

L'hydrolyse chimio-enzymatique du beurre de *I. gabonensis* produit des acides gras solides. La Figure III-16 présente la courbe de fusion du beurre et des acides gras obtenus après hydrolyse enzymatique. Le profil SFC mesure le pourcentage de graisse solide cristallisée à une température donnée. Le profil SFC montre que la fusion du beurre commence à 15°C et se finit à 50°C. Celle du beurre débute à 15°C et se termine à 50°C. Le point de fusion des acides gras est de 40,5°C et celui du beurre est de 44,4°C. La modification des triglycérides en acides gras ne modifie pas les propriétés thermiques du beurre.

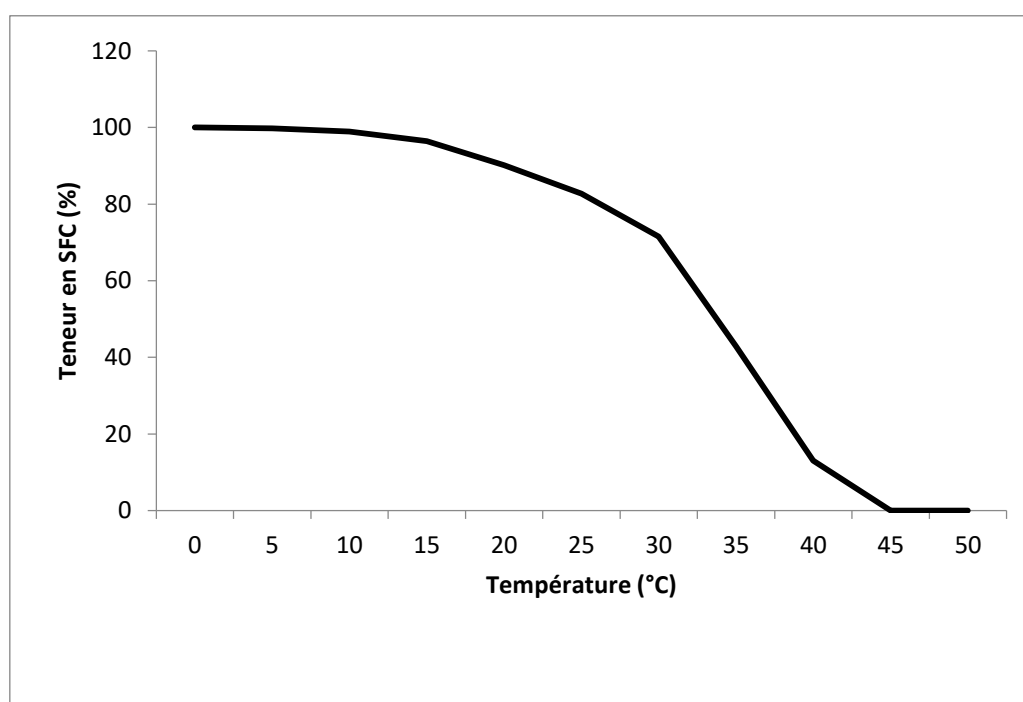


Figure III-16 : Teneur en SFC des acides gras de *I. gabonensis*

III.2.4. Analyse des phospholipides

Le Tableau III-9 présente les résultats de l'analyse des phospholipides du beurre de *I. gabonensis* comparés aux données de la littérature. La quantité totale en phospholipides est de 109 mg/100g. Cette variété de beurre de *I. gabonensis* est caractérisée par une très forte teneur en acide phosphatidique de l'ordre de 89,4±2,7% suivi de loin par l'acide phosphatidylinositol 6,7±1,4% et de l'acide phosphatidylcholine 3,9±1,2%. A l'opposé, l'étude réalisée par Oko et *al.*, sur l'analyse des phospholipides de la même espèce donne une teneur élevée en PC 61,76%, suivie de celle de PI 27,08% puis de PE 6,27% et de AP 4,42%. On pourrait attribuer cette forte

teneur en AP chez *I. gabonensis* à cause de la réaction d'hydrolyse. Il s'avère que les teneurs en indice d'acide libre et en acide gras libre du beurre ne justifient pas cette assertion. Il faut se résoudre à penser que la nature de la variété et/ou de l'espèce est un paramètre à considérer en tant que marqueur biologique tant pour la composition des lipides neutres (triglycérides) du beurre laurique que pour la composition de ses lipides polaires (phospholipides).

Tableau III-9 : Composition en phospholipides de *I. gabonensis*

Phospholipides	Cette étude	Okoko et al. 2015 (186)
	µg/100mg (% rel)	µg/100mg (%)
PE	0,0(0,0)	15,1 (6,27)
PS	ND	0,1 (0,04)
PI	7,3±0,7 (6,7±1,4)	65,0 (27,08)
PC	4,2±0,8 (3,9±1,2)	148, 2(61,76)
AP	98,3±14,8 (89,4±2,7)	10,6 (4,42)
LPC	ND	1,0 (0,42)
Total	109,8 ± 13,3	239,9

PE (Phosphatidyléthanolamine) ; PS (Phosphatidylsérine) ; PI (Phosphatidylinositol) ; PC (Phosphatidylcholine) ; AP (Acide phosphatidique) ; LPC (Lysophosphatidylcholine)

Conclusion

L'amande de *I. gabonensis* est une source importante de beurre végétal tropical (64%) constituée majoritairement de triglycérides. L'analyse de la morphologie des amandes a révélé la présence des corps lipidiques ou oléosomes répartis de façon uniforme et ayant des tailles de 30 à 60 µm dans lesquels se trouveraient les triglycérides, les protéines et les phospholipides constituants du beurre. Le pressage à chaud de *I. gabonensis* a permis d'extraire 48% de beurre par rapport à la masse de la graine en fonction de la taille de l'orifice et du tour de la presse. Ce qui représente 75% de la teneur totale en beurre. Le beurre est majoritairement composé des triglycérides MLM, LML, MMM avec les pourcentages de 31%, 23% et 14%. En ce qui concerne la composition en acides gras, ces triglycérides sont constitués essentiellement des acides gras myristique (51 %) et laurique (38 %). Il est solide à température ambiante et sa température de fusion est de 44°C. Il peut ainsi entrer dans la catégorie des huiles concrètes car solide à température et pression atmosphérique. L'hydrolyse des triglycérides par la lipase

Candida rugosa permet d'obtenir un beurre composé à 94% d'acides gras. Les propriétés thermiques ne sont pas modifiées voire améliorées. Par ce processus d'extraction par pressage du beurre et d'hydrolyse enzymatique de celui-ci, l'amande de *I. gabonensis* offre la possibilité de disposer des acides laurique et myristique dans des proportions élevées. Le beurre de *I. gabonensis* peut ainsi être utilisé pour la fabrication des margarines et comme des beurres de cuisson à cause de sa stabilité thermique mais aussi du fait de la non-dégradation des acides gras par l'absence des acides gras insaturés et polyinsaturés. On s'affranchit du recours à l'hydrogénation source des acides gras trans à problèmes sanitaires majeurs (maladie cardiovasculaire). De plus, l'apport de l'acide myristique via l'alimentation permettrait de réguler de nombreux mécanismes cellulaires (83,84). En effet, l'une des caractéristiques principales de cet acide gras est sa capacité à acyler les protéines : c'est la myristoylation. Il est le seul acide gras à former irréversiblement une liaison amide. L'acide myristique est également un substrat de la β -oxydation. Les acides myristique et laurique sont des acides gras à chaîne moyenne qui peuvent être utilisés industriellement pour la fabrication des savons et détergents. *I. gabonensis* fait partie de ces cultures peu connues pouvant répondre à la forte demande en huile laurique pour des applications alimentaires et non alimentaires.

Chapitre IV :

Etudes génériques et exploratoires de synthèse des esters de sucre d'acides gras à chaînes courtes

Introduction

La synthèse des esters de sucre est réalisée par des réactions de transestérification et d'estérification qui sont réversibles. Il s'avère que les réactifs utilisés, sucre et corps gras, sont immiscibles, hétérogènes et peu réactifs pour l'obtention de ces produits. Le choix du catalyseur et du milieu réactionnel sont des paramètres clés permettant de surmonter les difficultés liées à l'activation des centres réactionnels des réactifs de la réaction et leur mise en contact (187). Dans ce travail, la voie par catalyse chimique a été choisie pour l'obtention des esters de sucre et d'acides gras de beurre de *I. gabonensis*. Les sucres sont représentés par le glucose pris comme modèle et le mucilage de graine de chia choisi comme réactif hydrophile complexe. Les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire (160) ont permis de développer un procédé de synthèse des esters de saccharose par réaction de transestérification entre le saccharose et les esters méthyliques d'huile de palme par catalyse basique en milieu émulsion. Ce travail a pu résoudre plusieurs problèmes particulièrement celui de la mise en contact des réactifs grâce à l'utilisation d'ester de sucre (de haut degré de substitution constituant le produit final) comme tensioactif pour la formation d'une émulsion. Elle présente entre autre l'avantage d'effectuer la réaction sans solvant permettant l'utilisation directe des esters de saccharose dans les formulations sensibles alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques, etc... Ce procédé fonctionne à cette date au stade industriel chez le partenaire industriel. Pour aller dans le même sens, les voies de synthèse génériques sont explorées dans de nouveaux milieux par catalyse chimique pour aboutir à la mise en contact des réactifs et à l'obtention des esters de sucre de degré de substitution contrôlé. Ainsi, dans une première partie, l'étude de la mise en œuvre des réactifs en milieu eutectique est étudiée. Ensuite des essais de réaction de transestérification entre le glucose et le laurate de méthyle par catalyse basique en milieu eutectique vont être réalisés. Dans la deuxième partie de ce chapitre, les réactions d'estérifications entre les acides gras (acide laurique, acide myristique et acides gras du beurre de *I. gabonensis*) ou les polysaccharides (le mucilage) en présence de l'acide dodécylbenzène sulfonique (ADBS), utilisé comme catalyseur acide et tensioactif de la réaction, vont être explorées.

IV.1 Cas d'étude de réaction modèle de transestérification du glucose avec le laurate de méthyle en milieux DES profonds par catalyse basique

L'étude de la réaction de transestérification entre le glucose et le laurate de méthyle est effectuée en s'appuyant sur les travaux de Claverie et *al.* (160). La réaction est catalysée par le carbonate de potassium à la température de 120°C. K_2CO_3 faiblement hydraté s'est révélé être un catalyseur favorisant la réaction grâce à sa capacité à adsorber les réactifs pour la réalisation des réactions de transfert d'acyle. Selon ce schéma réactionnel, la réaction nécessite :

- i) d'utiliser un tensioactif pour la mise en œuvre d'une émulsion afin de faciliter la mise en contact des réactifs hétérogènes et immiscibles ;
- ii) d'éliminer tout au long de la réaction le méthanol formé ; pour déplacer l'équilibre de la réaction réversible vers les esters de glucose. Signalons que le méthanol est un co-produit indésirable pour les applications ultérieures des esters formés ;
- iii) d'appliquer la pression réduite et la température modérée afin d'éliminer le méthanol et de déplacer l'équilibre de la réaction vers le produit désiré.

Ces conditions opératoires optimisées ont constitué une base pour la mise en œuvre du montage représenté sur la Figure IV-1. Ce montage devrait permettre d'étudier et de réaliser la synthèse des esters de sucre à partir du glucose et du laurate de méthyle sans solvant par catalyse basique

IV.1.1. Essais de synthèse des esters de glucose sans ajout de tensioactif ni de solvant

Le montage utilisé pour réaliser cette synthèse (Figure IV-1) est constitué d'un réacteur batch relié à un agitateur mécanique afin d'assurer l'homogénéisation du milieu tout au long de la réaction. Le réacteur est fermé par un tricol surmonté d'un Dean Stark et d'un réfrigérant. Une sonde de température est plongée dans le bain d'huile.



Figure IV-1 : Photographie du montage utilisé pour la synthèse des esters de sucre par transestérification en catalyse basique en milieu DES.

Le laurate de méthyle et le catalyseur (K_2CO_3) sont préalablement homogénéisés à l'ultraturax pendant 10 min, et chauffés à $65^\circ C$. Le glucose solide est ajouté et le mélange est homogénéisé pendant 30 min. Le mélange est introduit dans le réacteur et agité à 500 rpm à une température de $90^\circ C$ et une pression de 7 mbar est appliquée. L'agitation du milieu devient inefficace au bout de 30 min : le milieu réactionnel, notamment le glucose se colore fortement s'épaissit et se fige. L'essai est stoppé. La couleur marron et l'odeur caractéristique d'un caramel suppose que des réactions de caramélisation se produisent. La caramélisation est un terme qui englobe toutes les réactions de dégradations thermiques des sucres en particulier les mono- et disaccharides réducteurs. Ainsi, dans ces conditions, le glucose subit une caramélisation au contact du K_2CO_3 .

Afin de surmonter les problèmes liés à la solubilité du glucose et à la miscibilité des réactifs, le travail a été redirigé vers l'utilisation des solvants eutectiques.

Dans le cadre de ce travail, la réaction de transestérification par catalyse chimique en milieu DES va être exploré. Le choix de travailler en milieu eutectique a été motivé par sa capacité à solubiliser les composés hydrophiles comme les sucres mais aussi dans le but de diminuer la température de la réaction.

IV.1.2. Synthèse par catalyse basique en milieu eutectique

Pour comprendre l'influence de la température sur l'état physique et chimique des milieux de synthèse, des expériences mettant en jeu les différents composés et des mélanges ont été soumis à différente température. Les essais ont été élargis à la choline entrant dans la préparation du DES. Le Tableau IV-1 présente ainsi l'aspect des composés et mélanges à température ambiante, leur aspect à 90°C et leur point de fusion. A température ambiante, tous les composés sont solides à l'exception du laurate de méthyle. Les températures de fusion du glucose (160°C), du laurate de méthyle (6°C) et du DES choline/glucose (ratio molaire 1/1) (76°C) ont été déterminées par DSC. Cette analyse a permis de déterminer de façon précise la température de fusion du mélange choline/glucose.

Tableau IV-1 : Aspect des réactifs à température ambiante, T_f et comportement du mélange des réactifs en fonction de la température

Réactifs individuels	Mélange de réactifs	Aspect à 25°C	T_f (°C)	Observation à 90°C
Glucose		Solide	160	Solide
Choline		Solide	302	Solide
K_2CO_3		Solide	891	Solide
Laurate de méthyle		Liquide	6	Liquide
	Choline+glucose (ratio molaire 1/1)	Solide	76	Liquide visqueux blanc

ND : non déterminé

IV.1.3. Réaction de transestérification entre le glucose et le laurate de méthyle en milieu eutectique

La Figure IV-2 présente le protocole des essais de synthèse des esters de glucose par catalyse basique en milieu eutectique profond (DES) mis en place pour la réalisation de cette réaction.

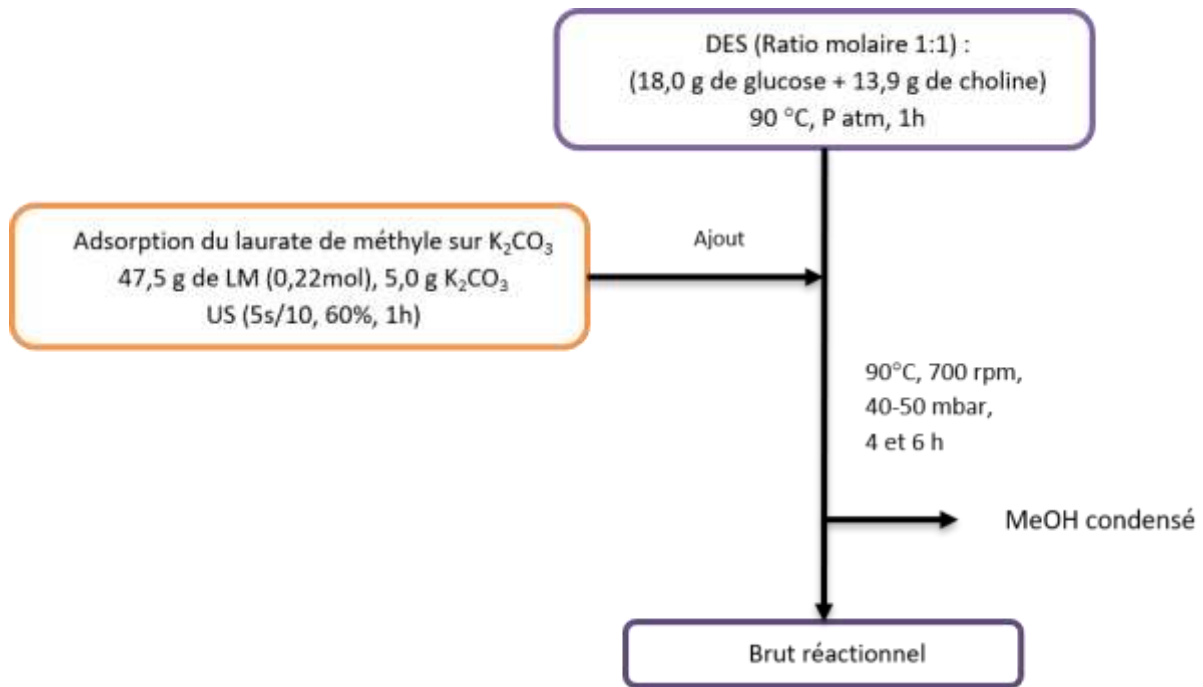


Figure IV-2 : Schéma de synthèse des esters de glucose en milieu eutectique profond par catalyse basique

La méthode suit la démarche suivante :

a. Une étape de préparation du DES

Le glucose (donneur d'hydrogène) et la choline (sel d'ammonium) sont pris dans un ratio molaire 1/1 (18,0 g de glucose et 13,9 g de choline). Ils sont pesés dans le réacteur batch et chauffés à 90°C à l'aide d'un bain d'huile. Le mélange est agité à 500 rpm pendant 1 h. Le mélange fond et devient homogène et liquide.

b. Une étape d'adsorption du laurate de méthyle sur le carbonate de potassium sous cavitation ultrasonore

Le laurate de méthyle et le carbonate de potassium sont mélangés et agités aux ultrasons pendant 1 h à pression atmosphérique. Les paramètres des ultrasons ont une amplitude de 60 % et une pulsation de 5s on/10s off. Dans ces conditions, la température du milieu atteint 80 °C.

c. Une étape de mise en charge du réacteur par le laurate de méthyle adsorbé sur le carbonate de potassium

Après 1 h de préparation, le laurate de méthyle adsorbé sur le carbonate de potassium est chargé dans le réacteur contenant le DES. L'ensemble est agité pendant 10 min. Le mélange se colore en marron puis devient noir-marron.

d. Une phase de mise sous pression réduite à température modérée du réacteur

Au bout de 10 min d'agitation du mélange DES choline/glucose et laurate de méthyle adsorbé sur le carbonate de potassium ($\text{LM}/\text{K}_2\text{CO}_3$), le milieu réactionnel est mis sous une pression réduite de 40-50 mbar. Une condensation dans le réfrigérant est observée.

Le Tableau IV-2 présente les essais réalisés pour cette étude. Les essais 1 et 3 ont été réalisés dans les mêmes conditions de réaction. Pour l'essai 4 la durée de réaction est modifiée. Concernant l'essai 2, l'étape d'adsorption du laurate de méthyle sur le carbonate de potassium a été réalisée sous agitation ultraturax pendant 15 min. Au cours de ces différents essais, la température de réaction est de 90 °C. Le chauffage est stoppé au bout de 4-6 h et le milieu réactionnel obtenu est constitué d'une phase liquide composée de l'ester méthylique non réagi et d'une phase visqueuse comprenant la choline, le glucose, le catalyseur et les produits de réaction. Ces deux phases sont séparées par décantation. L'ester méthylique n'ayant pas réagi est récupéré en le transvasant dans un autre récipient à température ambiante puis pesé pour la détermination du taux de conversion.

Tableau IV-2 : Essais de synthèse des esters de glucose par catalyse basique en milieu eutectique

Essais	n_{LM} (mol)	Traitement LM/K ₂ CO ₃	Pression (mbar)	Temps (h)
1	0,22	US (5s on /20s off, 60%, 1h)	45±5	4
2	0,20	ULT (17 000 rpm, 15 min)	40	4
3	0,24	US (5s on /20s off, 60%, 1h)	45±5	4
4	0,24	US (5s on /20s off, 60%, 1h)	45±5	6

IV.1.4. Résultats et discussions

a. Bilan de matière

Le taux de conversion par rapport à l'ester méthylique obtenu à partir du laurate de méthyle (LM) n'ayant pas réagi est calculé comme suit :

$$\text{Taux de conversion (\%)} = \frac{\text{masse initial (LM)} - \text{masse récupéré (LM)}}{\text{masse initial (LM)}}$$

Le Tableau IV-3 regroupe les résultats obtenus à partir des expériences réalisées. Les taux de conversion des essais 1 (37,7 %) et 3 (35, 4) montrent que la réaction est reproductible. Le prolongement du temps de réaction de l'essai 4 n'augmente pas le taux de conversion (37,9 %) de l'ester méthylique par rapport aux essais 1 et 3. Au bout de 4 h, le taux de conversion est de 37,7 % et de 37,9 % après 6 h de réaction. Dans ces conditions une durée de 4 h de réaction constitue le temps nécessaire pour la conversion de l'ester méthylique. Lorsque le mélange LM/K₂CO₃ est traité à l'ultraturax pendant 15 min, le taux de conversion est de 12 %. Le traitement préalable du catalyseur avec l'ester méthylique constituerait une étape clé dans le procédé de synthèse. Le catalyseur ne serait pas assez dispersé dans le laurate de méthyle au bout de 15 min par agitation ultraturax. La quantité d'ester méthylique adsorbée à la surface du catalyseur n'est pas suffisante pour favoriser la réaction de transfert de matière.

Tableau IV-3 : Bilan de matière et taux de conversion du laurate de méthyle (LM)

Essais	m _{LM} récupéré (g)	LM converti (mol)	Taux de conversion (%)
1	29,68 (0,138)	0,083	37,7
2	37,75	0,024	12,0
3	33,63	0,085	35,4
4	31,57	0,091	37,9

Dans les conditions comparables, les résultats obtenus par Zhao et *al.* (147) pour la synthèse des esters de glucose d'acide gras par catalyse enzymatique dans divers milieux eutectiques donnent des taux de conversion inférieurs à 15 %. Selon les travaux de Durand et *al.* (2013) (188), concernant la réaction de transestérification entre l'ester méthylique *p*-coumarate et l'octanol par catalyse enzymatique, l'ajout d'eau améliore l'activité de l'enzyme et change la réactivité du substrat phénolique. Dans le DES pur ChCl/urée (ratio molaire 1/2), un taux de conversion inférieur à 2% a été obtenu. Lorsque que l'eau (10% en masse) est ajoutée, un taux de conversion de 98 % avec un rendement de 93% a été obtenu. Pour le DES ChCl/Glycérol-eau, le taux de conversion était de 62% pour 10% d'eau. L'ajout d'eau permet de réduire la viscosité et favorise le transfert de masse. Dans une autre étude, Durand et *al.* ont montré que les DES constitué entre le chlorure de choline et l'urée ou le glycérol, permettent d'obtenir une conversion totale (100%) pour une réaction de transestérification entre le laurate de vinyle et les alcools (butanol, octanol, octadecanol) en présence de la lipase *Candida antarctica* B (i CALB) (189).

Il serait ainsi intéressant d'étudier la réaction de transestérification en catalyse basique avec d'autres types de DES tel que ChCl/urée ChCl/Glycérol et en faisant varier le ratio des constituants du DES.

b. Caractérisation des milieux et bruts réactionnels par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)

Le Tableau IV-4 présente les temps de rétention et les aires de chacun des pics caractérisés par HPLC en utilisant comme solvant d'élution le mélange acétone/eau dans un ratio 1:1 (v/v en mL) et une colonne apolaire C18. 10 mg de la phase visqueuse de l'essai 1 sont dilués dans 1 mL de mélange acétone/eau (ratio 1:1 v/v mL) et injectés pour le suivi qualitatif de la formation de produits au cours de la réaction.

Le glucose, la choline et le catalyseur sortent en premier de la colonne 2,5 et 5 min. Leur nature hydrophile élevée n'a pas permis une séparation de ces pics dans cette colonne apolaire. L'ester méthylique est ensuite élué à 9,58 min. Entre 17 et 31 min, trois pics inconnus sont détectés. Le pic ayant un temps de rétention de 28,11 min correspond à un produit obtenu par réaction d'estérification par catalyse organisé par l'ADBS (résultat non présenté) révélant ainsi l'obtention des esters de glucose par cette méthode.

Afin de vérifier s'il s'agissait des produits attendus que sont les esters de glucose et ne disposant pas des standards analytiques, des analyses RMN ^1H et ^{13}C ont été réalisées pour une analyse structurale des constituants de ce brut réactionnel obtenu de la phase visqueuse.

Tableau IV-4 : séparation par CLHP des constituants de la phase visqueuse du brut réactionnel de l'expérience 1

	Temps de rétention (min)	Aire relative
Glucose, choline	2,5-5	
Laurate de méthyle	9,58	5,12
Pic 1	17,91	26,92
Pic 2	28,11	52,64
Pic 3	30,90	15,32

c. Caractérisation structurale par spectroscopie RMN des réactifs

Les analyses RMN ^1H et ^{13}C ainsi que les analyses 2D COSY, HSQC et HMBC ont été réalisées sur les bruts réactionnels dans le DMSO- d_6 .

- **Chlorure de choline**

La choline est un composé bifonctionnel contenant à la fois un sel d'ammonium quaternaire et un alcool (Figure IV-3). Le Tableau IV-5 présente les déplacements chimiques des protons et carbones de la choline. Les Figure IV-4 et Figure IV-5 présentent les spectres ^1H et ^{13}C du glucose dans le DMSO- d_6 .

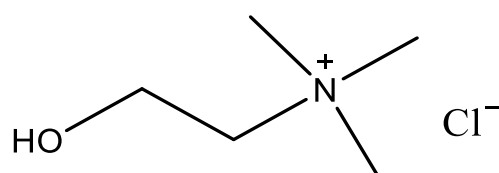


Figure IV-3 : Formule semi-développée du chlorure de choline

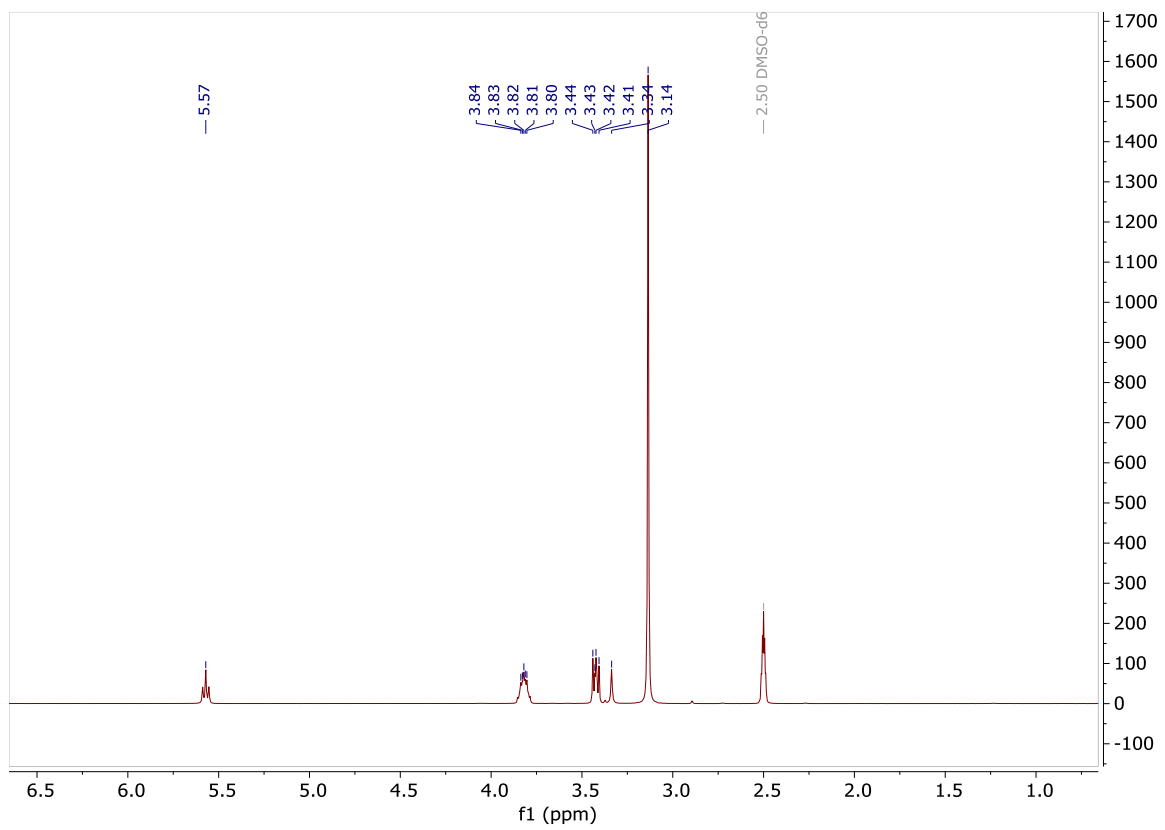


Figure IV-4 : Spectre ^1H RMN de la choline

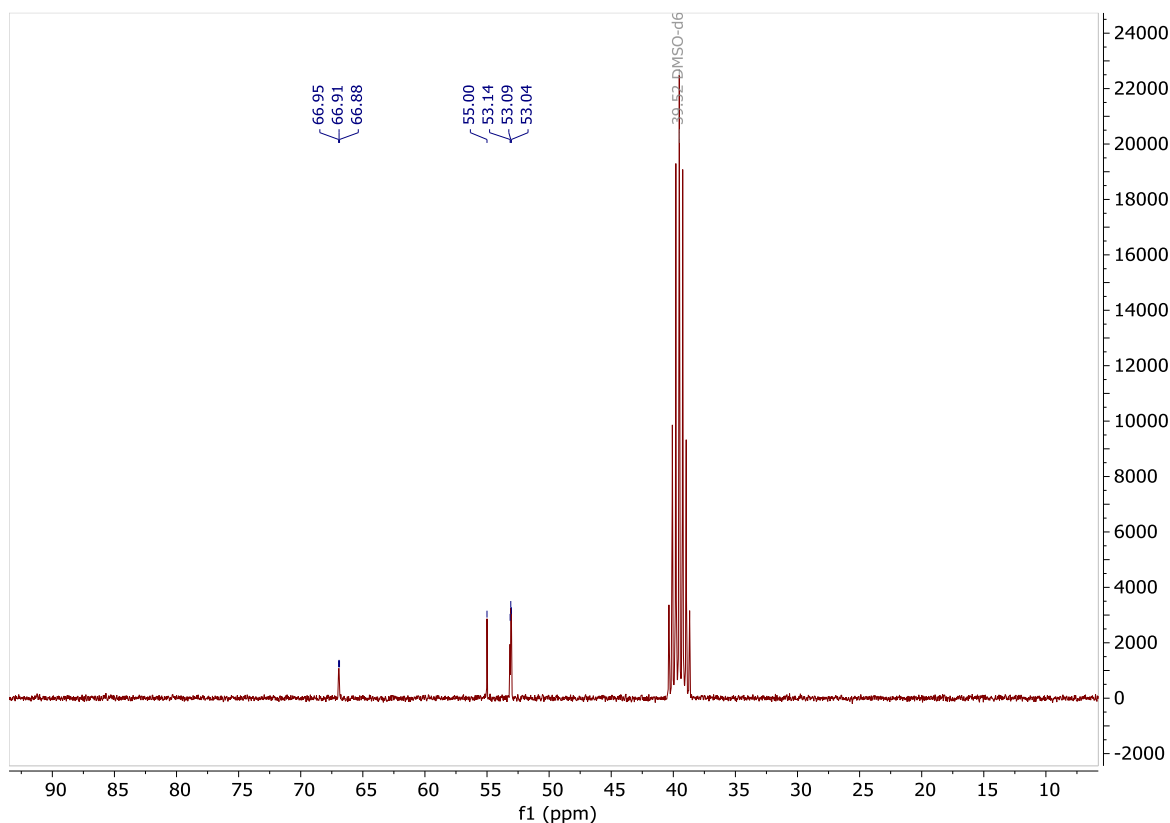


Figure IV-5 : Spectre ^{13}C RMN de la choline

Tableau IV-5 : Déplacements chimiques des protons et carbones du chlorure de choline

Fonction	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
HO-CH ₂	3,87	55,55
CH ₂ -N ⁺	3,47	67,46
CH ₃	3,13	53,43

- **Glucose**

Le glucose est un ose ou monosaccharide réducteur. Il possède un groupe aldéhyde ou est capable d'en former. C'est un aldose dont les groupes hydroxyles sont disposés selon une configuration déterminée le long d'une chaîne formée de six atomes de carbone. Il peut adopter une configuration à chaîne ouverte ou cyclique.

Le glucose utilisé est de forme cyclique et présente les deux formes anomériques α et β (Figure IV-6). La Figure IV-7 et la Figure IV-8 présentent les spectres ^1H et ^{13}C du glucose dans le D₂O. Les attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones (Tableau IV-6)

ont été réalisées à partir des spectres 2D ainsi que des données recueillies dans la littérature (190).

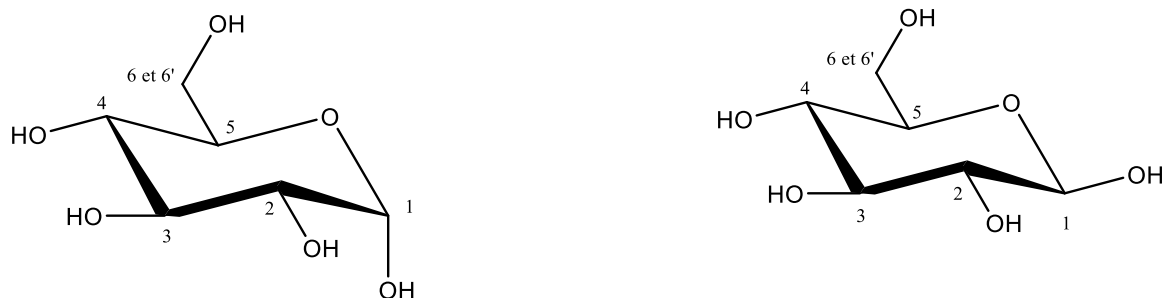


Figure IV-6 : Formule semi-développée des formes anomériques α et β du glucose

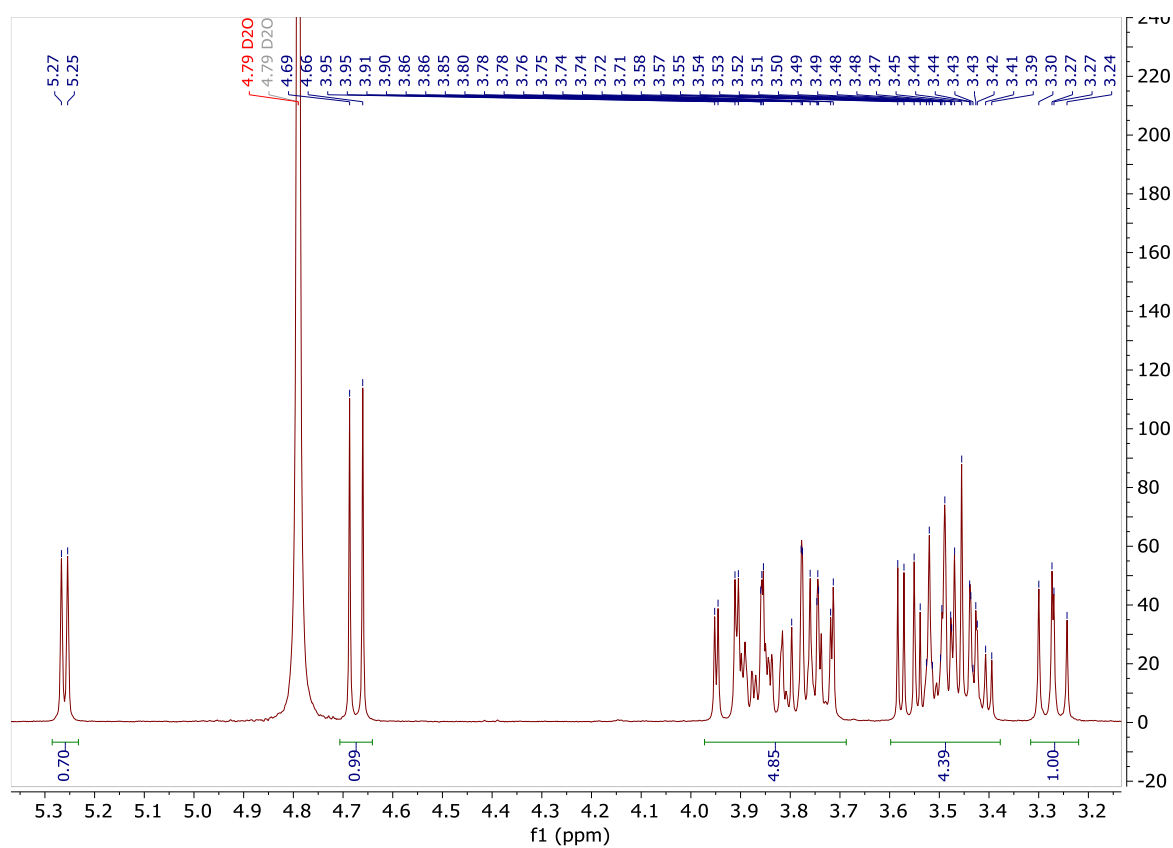


Figure IV-7 : Spectre ^1H RMN du glucose

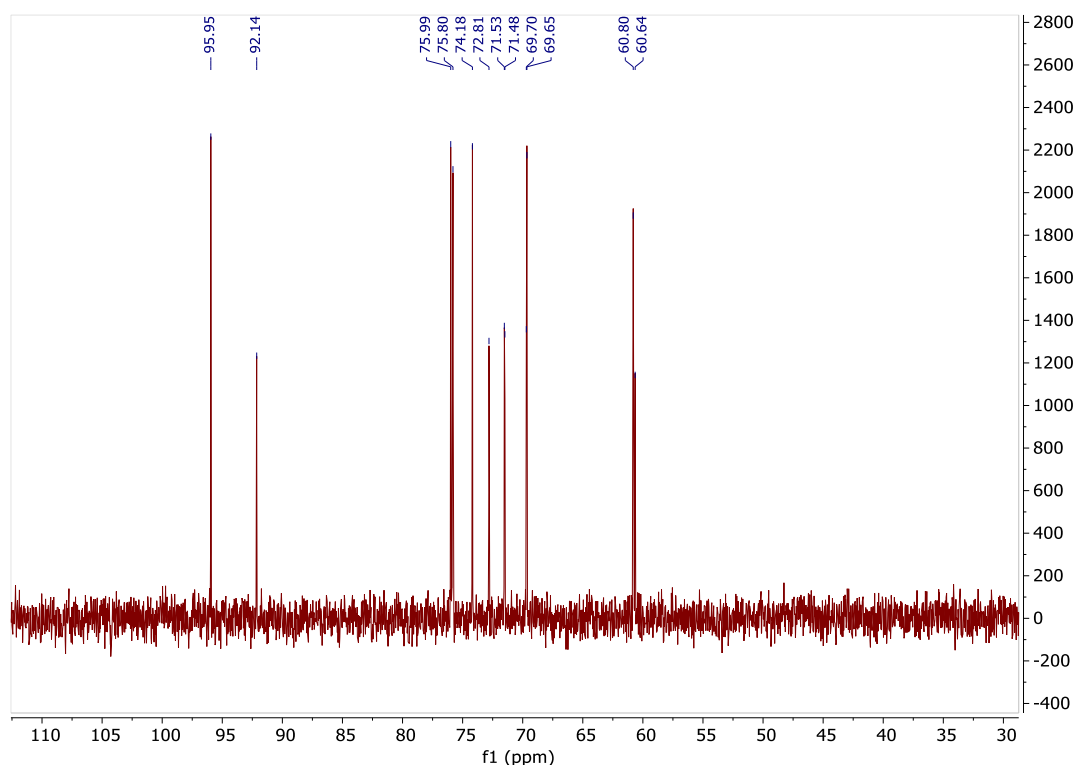


Figure IV-8 : Spectre ^{13}C RMN du glucose

Tableau IV-6 : Déplacements chimiques des protons et carbones du glucose

	α		β	
	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
1H, H1 (C1)	5,22	92,14	4,62	95,58
1H, H2 (C2)	3,82	71,47	3,23	74,17
1H, H3 (C3)	3,7	72,8	3,4	75,79
1H, H4 (C4)	3,39	69,69	3,39	69,64
1H, H5 (C5)	3,54	71,52	3,45	75,98
2H, H6 et H6', (C6)	3,73	60,63	3,89	60,79

- **Laurate de méthyle**

Le laurate de méthyle est un ester méthylique d'acide gras de l'acide laurique. Il est obtenu par réaction entre l'acide laurique et le méthanol. La Figure IV-9 présente sa formule semi-développée. Les Figure IV-10 et Figure IV-11 présentent les spectres proton et carbone du

laurate de méthyle dans le chloroforme deutéré. Les attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones (Tableau IV-7).

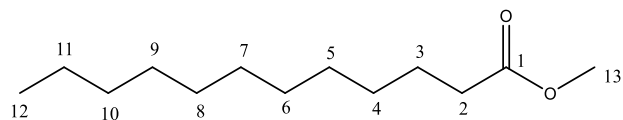


Figure IV-9 : Formule semi-développée du laurate de méthyle

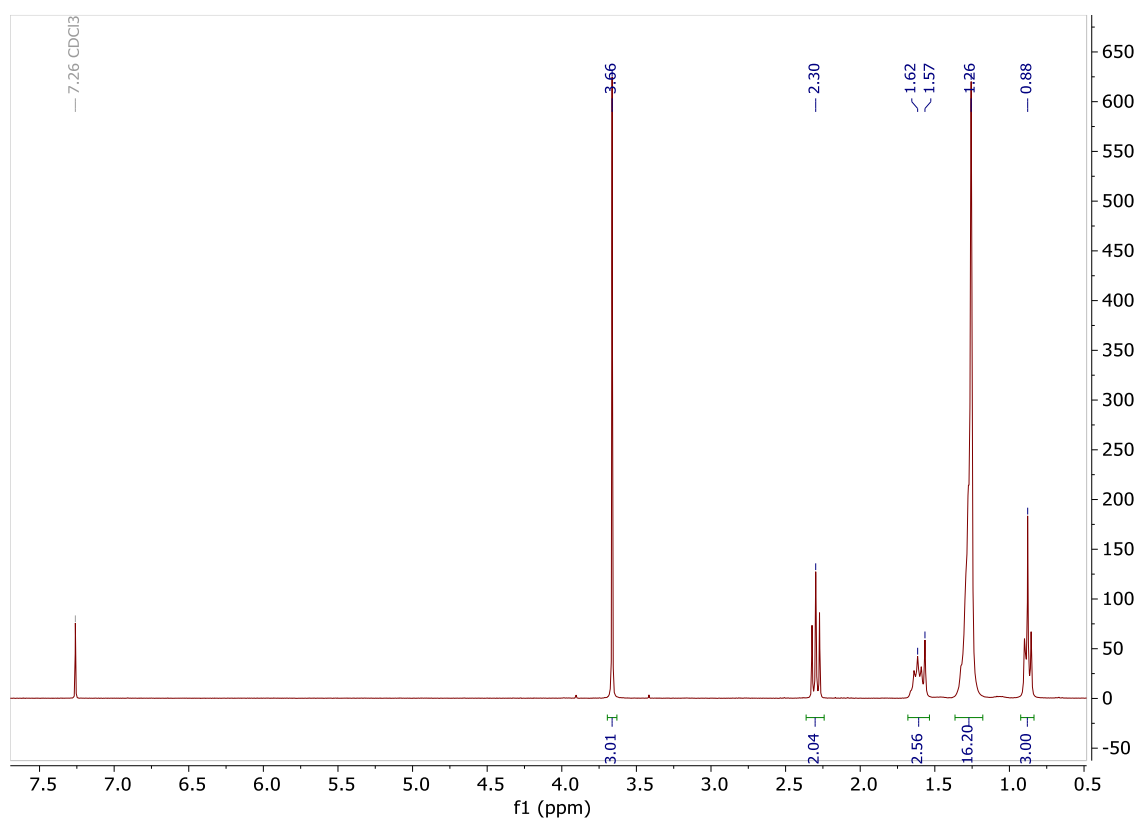


Figure IV-10 : Spectre ^1H RMN du laurate de méthyle

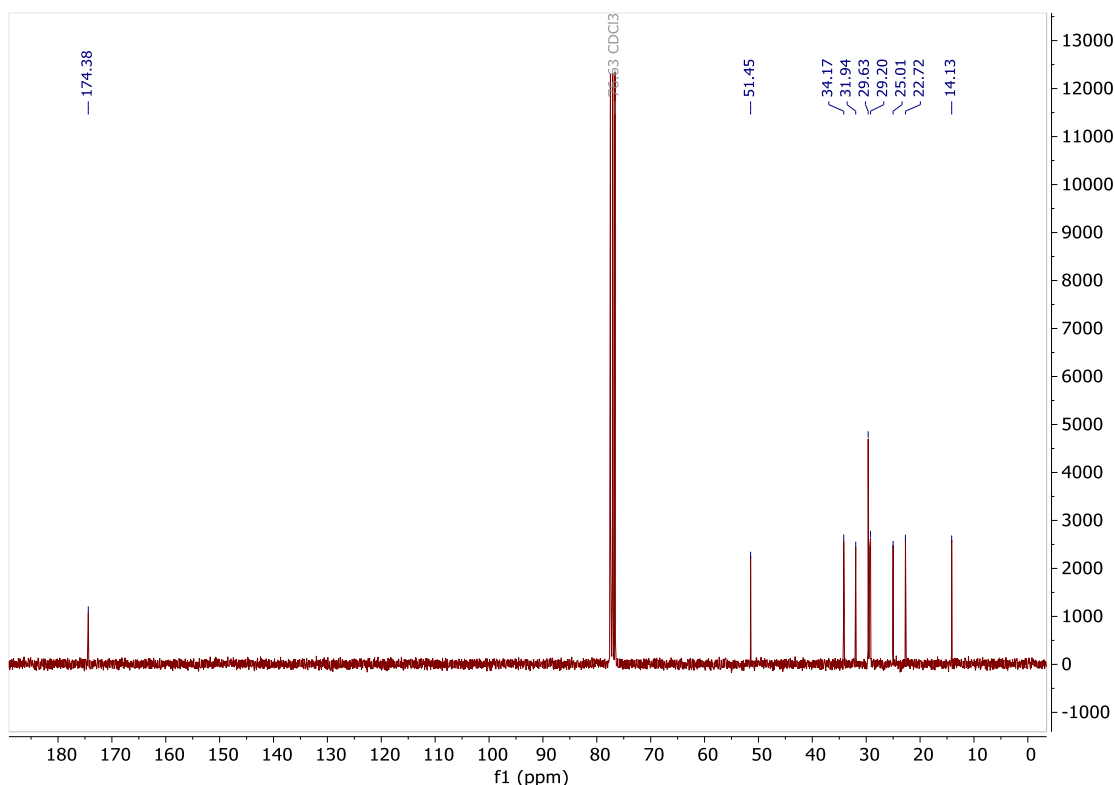


Figure IV-11 : Spectre ^{13}C RMN du laurate de méthyle

Tableau IV-7 : Déplacements chimiques des protons et carbones du laurate de méthyle

	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
-C=O (ester)		174,38
-OCH ₃	3,66	51,45
2H (-CH ₂ COOCH ₃)	2,230	34,17
2H (-CH ₂ -CH ₂ -COOCH ₃)	1,57	25,01
16H (-CH ₂ -)	1,26	22,58-29,46
3H (-CH ₃)	0,88	14,42

d. Caractérisation structurale par spectroscopie RMN des bruts réactionnels.

Le solvant utilisé est le DMSO- d_6 dont les déplacements chimiques des protons et carbones apparaissent respectivement à 2,5 ppm et à 40 ppm. L'analyse réalisée est du carbone quantitatif. Il est donc possible à partir du spectre carbone de quantifier les produits formés.

Dans un premier temps, les déplacements chimiques correspondant à la choline et à l'ester méthylique ont été identifiés sur les spectres ^1H et ^{13}C (Figure IV-12 et Figure IV-13). Sur le

spectre RMN ^1H (Figure IV-12), les pics situés entre 0,8 et 2,5 ppm montrent la présence de la chaîne grasse provenant de l'ester méthylique : un triplet du CH_3 terminal à 0,83 ppm, un singulet intégrant pour les 16H de CH_2 à 1,21 ppm, les carbones en β et en α de la fonction carbonyle respectivement à 1,64 et 2,25 ppm. A 3,60 ppm, se retrouve le déplacement caractéristique des hydrogènes du groupe méthyle (O-CH_3) sous forme de singulet de l'ester méthylique n'ayant pas réagi. Les déplacements des hydrogènes du glucose sont localisés dans la région de 3 à 5 ppm. L'intégration des protons de la choline à 3,14 ppm, 3,42 ppm et 3,82 ppm peut être affectée par la présence des protons du glucose. Les valeurs obtenues sont légèrement supérieures à celles attendues (intégrales de 2,33 et 2,31 au lieu de 2 pour les protons à 3,42 ppm et 3,82 ppm). Les déplacements chimiques des protons à 8,36 et 8,45 ppm montrent qu'il y a la formation de nouvelle espèce chimique. La composition du milieu nous emmène à considérer la possibilité de réaction entre le K_2CO_3 et le glucose et/ou le laurate de méthyle et/ou la choline.

Sur le spectre du carbone (Figure IV-13), les pics caractéristiques de la chaîne grasse peuvent être identifiés entre 14 et 35 ppm. Les déplacements à 53, 55 et 67 ppm correspondent aux déplacements des carbones de la choline.

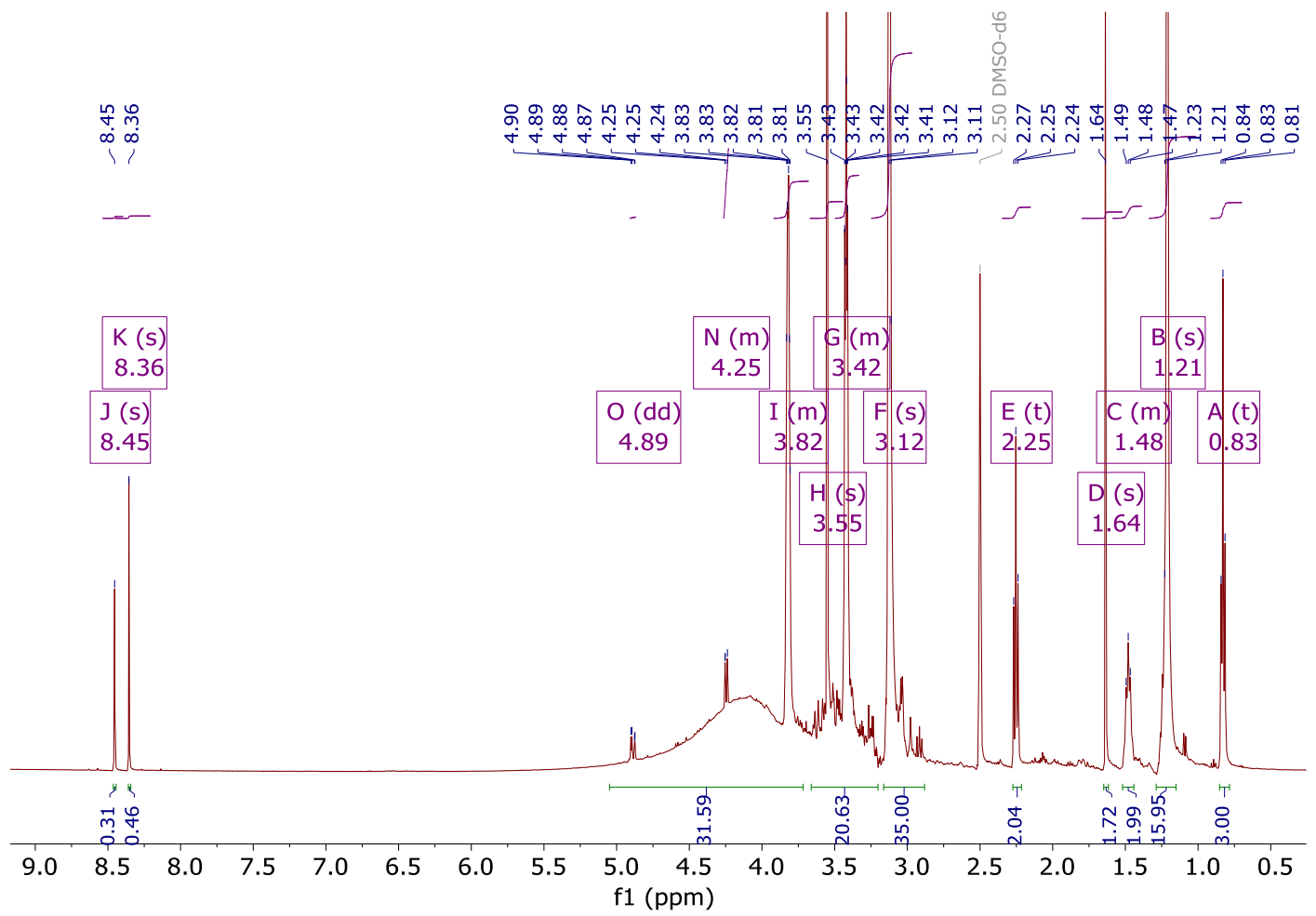


Figure IV-12 : Spectre ^1H du brut réactionnel de l'expérience 4

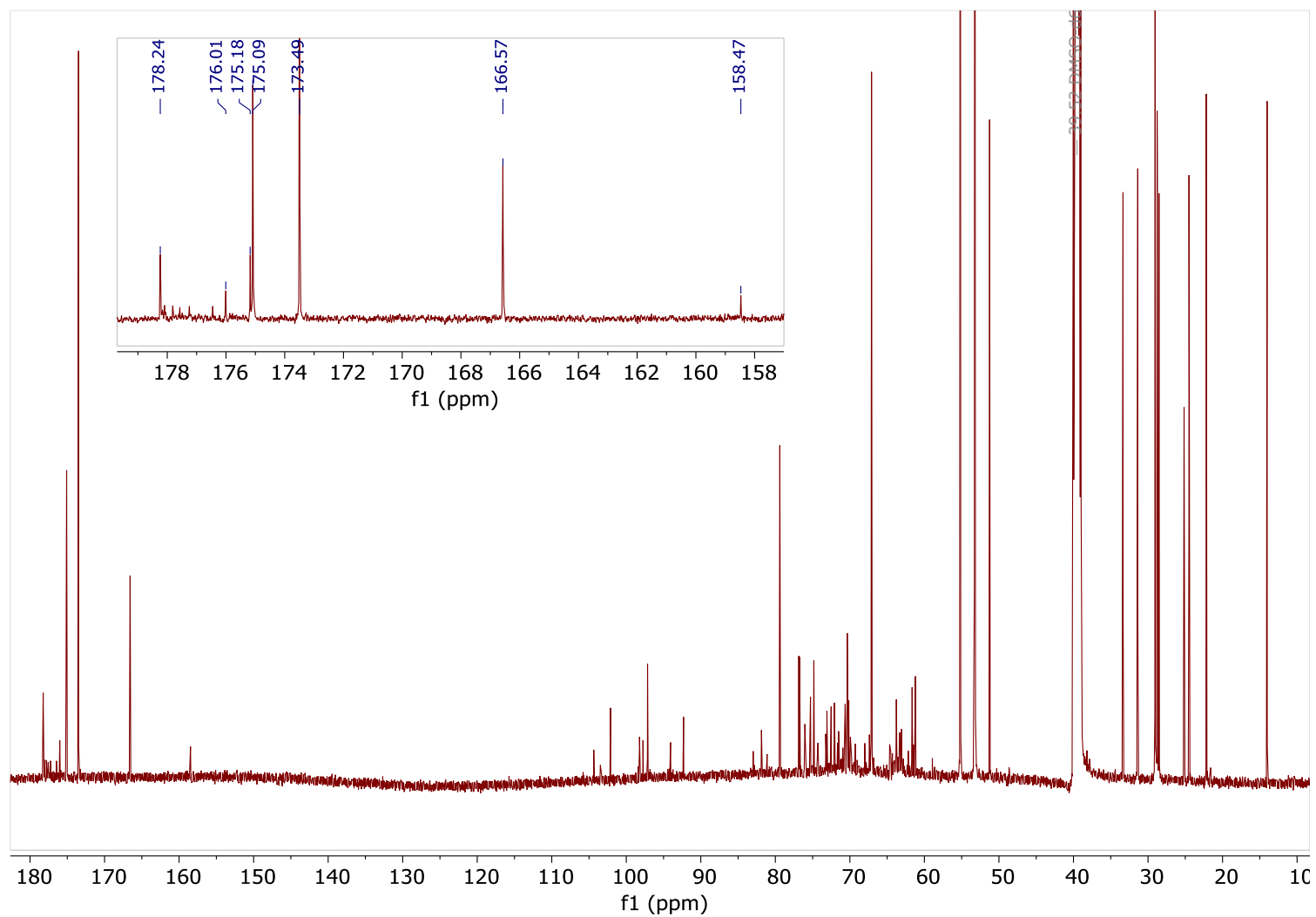


Figure IV-13: Spectre RMN ^{13}C du brut réactionnel de l'expérience 4

Entre 60 et 110 ppm, on trouve les pics correspondant aux déplacements chimiques des carbones du glucose. Le pic à 60 ppm correspond aux déplacements chimiques des carbones C6 et C6' du glucose libre n'ayant pas réagi. Entre 63 et 65 ppm, de nouveaux pics sont apparus et peuvent indiquer une modification chimique au niveau des carbones C6 et C6' du glucose. Ces déplacements chimiques peuvent correspondre à l'acylation du glucose.

Les pics à 92 et 97 ppm représentent les carbones anomériques α et β du glucose libre. Entre ces deux valeurs se trouve un pic à 94 ppm qui représenterait la forme β estérifiée du carbone anomérique du glucose selon les données bibliographiques à cause de sa localisation entre les formes α et β non estérifiées (191).

De 166 à 180 ppm, se trouve la région des groupes carbonyles. Au total 5 pics significatifs sont répertoriés.

Les déplacements chimiques à 166 et 158 ppm correspondraient également à des carbonyles mais ne présente aucune corrélation visible en HMBC. Ces carbonyles sont plus blindés que les autres et auraient donc dans leur entourage un groupe donneur d'électrons. Le pic à 166 ppm correspondrait à l'ion carbonate. Celui à 158 ppm à la formation de groupe carbonate avec le glucose (Figure IV-14).

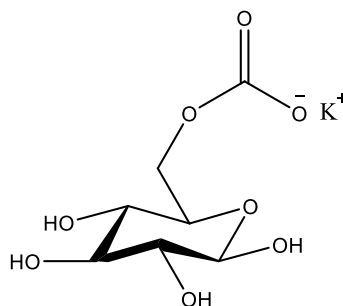


Figure IV-14 : Structure du carbonate formé avec le glucose

Le Tableau IV-8 présente les déplacements chimiques des esters de glucose obtenus dans les études précédentes. Pour un ester de glucose acylé en position 6, les corrélations en HMBC entre le carbonyle de l'ester et les protons H6, H6' sont observés à des déplacements supérieurs à 4 ppm.

Tableau IV-8 : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C des esters de glucose décrits dans la littérature

Références	Liang et al. 2012 (94)		Ren et al. 2017 (117)	
	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
C1	4,88	93,02	4,91	92,75
C2	3,12	72,82	3,14	72,66
C3	3,02	74,07	3,44	73,33
C4	3,40	70,84	3,04	71,03
C5	3,75	69,80	3,77	69,60
C6a, C6b	4,26 et 3,96	64,14	4,28 et 4,01	64,36
-C=O		175,17		173,27
2H (-CH ₂ COO-glucose)	2,26	34,55	2,28	33,91
2H (-CH ₂ -CH ₂ -COO-glucose)	1,49	25,25	1,52	31,81
16H (-CH ₂ -)	1,24	23,02-30,02	1,25	22,59-29,5
3H (-CH ₃)	0,84	14,14	0,87	14,42

Dans les résultats obtenus, l'analyse du spectre HMBC (Figure IV-15) montrent des corrélations entre des carbonyles et des protons. Le carbonyle à 173,8 ppm couple avec les protons à 3,56 ppm, 2,26 ppm et 1,49 ppm et celui à 175,4 ppm corrèle avec les protons à 3,43 ppm et 1,65 ppm.

L'absence des corrélations à 4-5 ppm pourrait s'expliquer par la faible concentration de produit par rapport à la choline si la réaction a eu lieu et que l'acylation à la position 6 du glucose a été réalisée. Il est également possible que l'acylation se soit déroulée sur un autre hydroxyle du glucose.

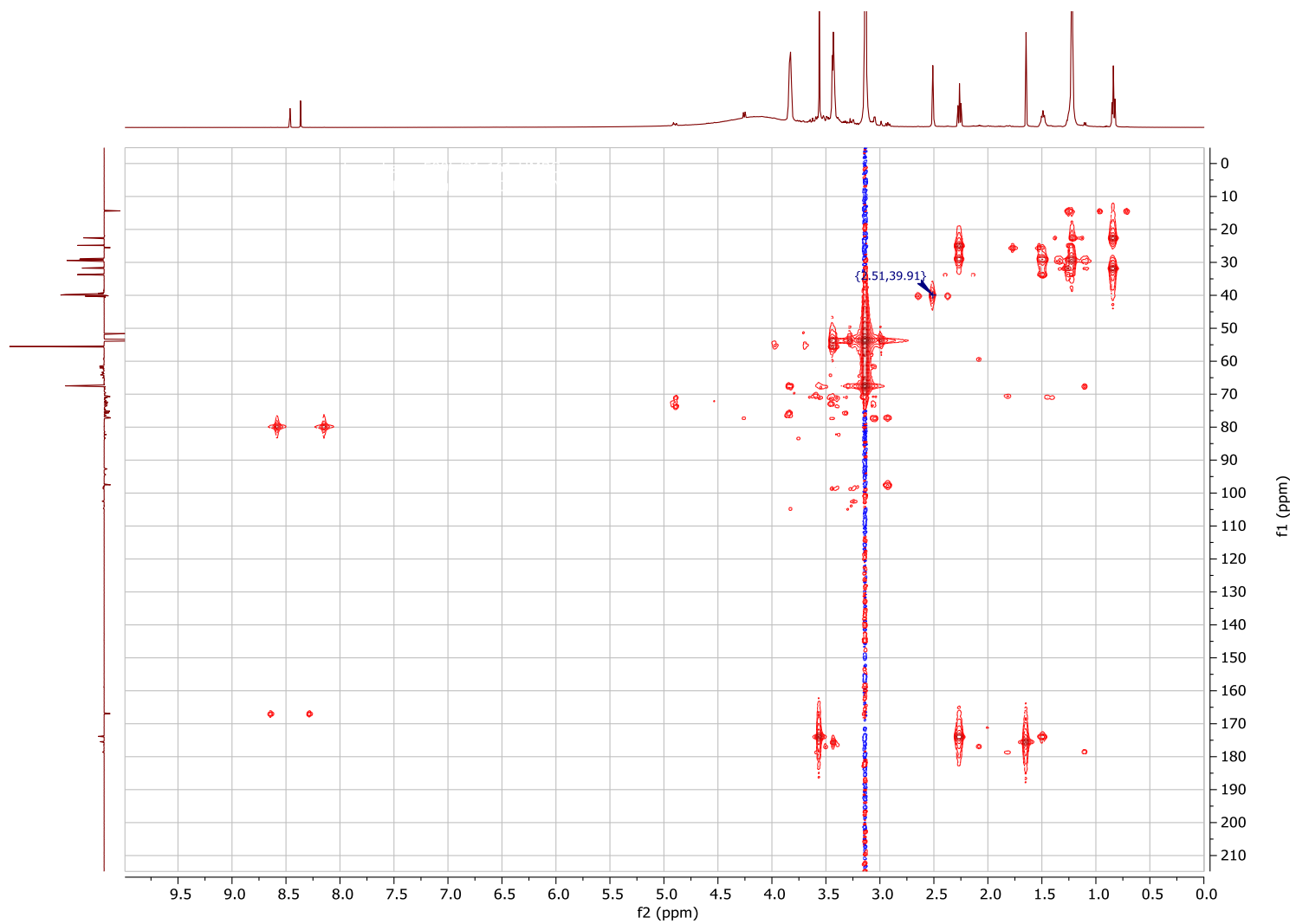


Figure IV-15: Spectre HMBC du brut réactionnel de l'expérience 4

Conclusion

Les études exploratoires ont conduit à la synthèse des esters de glucose par la mise en œuvre de la réaction de transestérification du glucose avec le laurate de méthyle. D'un point de vue procédé, il est possible de réaliser en continu les séquences de réaction et séparation et recyclage de réactif. Le méthanol est co-produit et retiré en continu. Le laurate de méthyle est également recyclé. Ainsi le procédé peut être continu et productif en mono-, di-, triester de glucose et d'acide laurique. La réaction a permis d'obtenir un taux de conversion de 40 %. Ce taux de conversion correspondrait à la formation de trois produits. A notre connaissance, ce procédé par catalyse chimique faisant intervenir les DES profond est mieux positionné par rapport à celui décrit par Pöhnlein et *al.* (2015) (148) et Zhao et *al.* (2016) (147) réalisé par catalyse enzymatique dont les taux de conversion sont inférieurs à 15%. D'autre part, il serait intéressant de réaliser des synthèses supplémentaires un DES ChCl/urée.

L'analyse structurale des constituants préfigurés dans le brut réactionnel de nature visqueuse par RMN révèle l'apparition de plusieurs déplacements chimiques dans la zone des carbonyles. Il se pose la question de la sélectivité en mono-, di-, triester de glucose et d'acide laurique. Cependant, pour un milieu aussi complexe, cette méthode reste limitée sans une purification préalable du brut réactionnel. Une méthode de purification doit être mise en place afin de récupérer les produits formés et de mieux les caractériser.

Les propriétés des produits purs et des bruts réactionnels pourront être étudiées et comparées avec celles des produits purs.

Cette voie de synthèse ne sera pas utilisée dans le cas de la synthèse des esters de mucilage car elle mérite avant tout d'être améliorée dans le cadre des réactions avec des sucres simples.

IV.2. Cas d'étude de réaction modèle d'estérification du glucose avec les acides laurique, myristique et mélange d'acides laurique et myristique de *I. gabonensis* en milieu organisé

Les acides laurique, myristique et les acides gras de *I. gabonensis* sont solides à température ambiante. Mis en contact avec le glucose, ils forment un système binaire.

Un des leviers pour surmonter l'hétérogénéité du système binaire est d'utiliser un milieu organisé. Sera-t-il aussi approprié pour catalyser la réaction d'estérification entre le glucose et les acides gras à chaînes courtes ? L'acide dodécylbenzène sulfonique ADDBS est retenu pour atteindre ce but. En 1999, l'équipe a initié cette approche en utilisant l'acide paratoluènesulfonique dans la réaction d'estérification de l'acide oléique avec le glycérol pour l'obtention des esters partiels de glycérol et de l'acide oléique en milieu organisé sous forme d'émulsion stable huile/eau formée *in situ*. L'addition du tamis moléculaire contribue à l'élimination continue de l'eau formée. Le procédé mis au point fonctionne en discontinu en réacteur batch agité ou en continu en réacteur colonne à quatre éléments (192). Les travaux de Manabe et *al.*, en 2001 se sont révélés être le premier exemple de système organisé avec l'acide dodécyl benzène sulfonique (ADDBS) sur l'estérification directe d'acides carboxyliques lipophiles avec des alcools lipophiles (193). L'ADDBS est depuis étudié en catalyse dans des réactions telles que les réactions de déshydratation, estérification, transestérification, amidation, etc (2,194–198). Nowicki et *al.* ont étudié la synthèse d'alkyl glucosides en utilisant l'ADDBS comme catalyseur d'alkylpolyglucosides (199). Dans le cas des réactions telles que l'estérification ou l'éthérification, gênées par la présence d'eau, l'ADDBS présente l'avantage de faciliter ces réactions en milieu aqueux. Le choix de ce catalyseur est motivé par sa structure organique amphiphile. Il est constitué par un groupe sulfonique au comportement d'acide de Brönsted et par la chaîne hydrophobe hydrocarbonée et aromatique qui en font un excellent tensioactif *in situ* approprié pour la formation de micelles.

IV.2.1. Mise en contact des réactifs

Système pseudo-ternaire Glucose (solide)/Acides gras (solide) /ADDBS (liquide)

La Figure IV-16 présente l'observation au microscope optique du mélange constitué par le glucose et l'acide myristique pris en ratio molaire 2/1 en présence de l'ADDBS à 0,12 équivalent. Le mélange est liquéfié à 50°C puis agité à 500 rpm. On observe des particules cristallines de taille moyenne de 10-200 µm, de formes variées correspondant au glucose solide réparties dans les acides gras liquéfiés. Ainsi ce système est immiscible et hétérogène. Le rôle de l'ADDBS en

tant que tensioactifs est de compatibiliser ces deux réactifs pour des systèmes évolutifs pseudo-homogènes organisés autour de l'ADBS (2,199). En tant qu'acide de Brønsted, l'ADBS catalyse la réaction d'estérification pour l'obtention des esters de glucose. Au fur et à mesure de leur formation, les esters de glucose de l'acide myristique par leurs propriétés tensioactives contribuent à renforcer la formation des systèmes évolutifs pseudo-homogènes dans lesquels la réaction d'estérification évolue de façon dirigée. Nous estimons que des organisations comparables seront rencontrées avec les autres systèmes glucose/acide laurique/ADBS et glucose/mélange d'acides laurique-myristique/ADBS

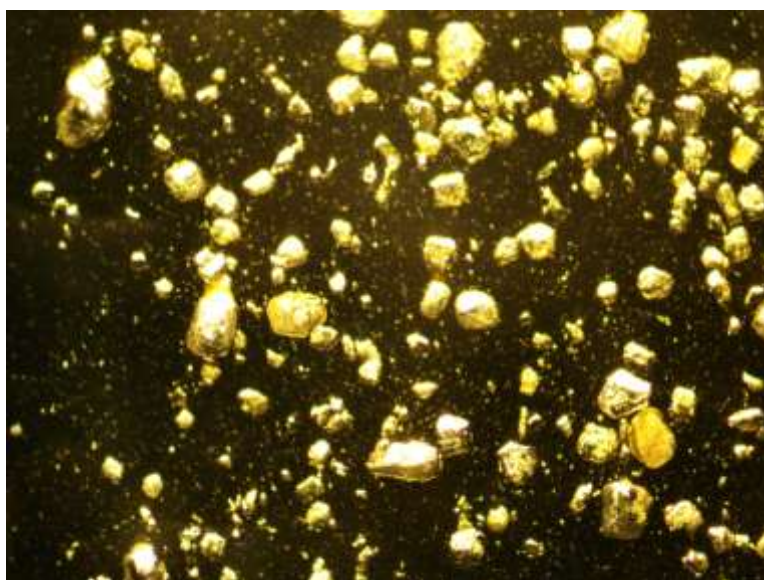


Figure IV-16 : Observation au microscope optique du mélange Glucose/acide myristique (ratio molaire 2/1) en présence de 0,12 équivalent molaire (acquisition $\times 10$)

IV.2.2. Protocole de synthèse

La réaction est réalisée en utilisant un montage constitué d'un réacteur batch de 500 mL surmonté d'un tricol équipé d'un agitateur mécanique, d'un Dean Stark, d'un réfrigérant, et d'une sonde de température ; Le chauffage se fait en utilisant un bain d'huile. L'étude de la réaction d'estérification entre l'acide gras (acide laurique, myristique ou le mélange des acides gras de *I. gabonensis*) et le glucose, est effectuée en présence de l'ADBS utilisé comme catalyseur. L'acide gras (22,8 g) et l'ADBS (4,0 g) sont pesés dans un ratio catalytique de 12 % et mélangés dans le réacteur à 80°C sous agitation mécanique (500 rpm). Le glucose est

ajouté. Le milieu réactionnel est maintenu à la température de 80°C sous agitation mécanique, ultraturax ou ultrasonore pendant 8 h à pression atmosphérique.

Motivé par la preuve du concept, les milieux réactionnels sont utilisés en l'état sans traitement post-réactionnel pour réaliser l'analyse et la caractérisation des constituants formés in situ au terme de la réaction d'estérification du glucose et de l'acide laurique.

IV.2.3. Caractérisation des produits de la réaction par RMN

a. Analyse des milieux réactionnels par spectroscopie de masse

- Caractérisation des constituants formés dans le milieu réactionnel obtenu de la réaction entre le glucose et l'acide laurique

L'analyse a été réalisée sur le milieu réactionnel obtenu à partir de la réaction entre le glucose et l'acide laurique (ratio 1:1) en présence d'ADBS (0,12 équivalent) à 80°C pendant 8 h (Figure IV-17).

Le monolaurate de glucose de formule brute $C_{18}H_{34}O_7$ possède une masse molaire exacte de $M_1=362,45$ g/mol. Sur ce spectre, on observe la masse de la molécule ionisée $[M]^+$ correspondant au pic $m/z=362,3$ et celle de $[M_1+H]^+$ correspondant au pic $m/z=363,3$. Le pic $m/z=380,3$ correspond à l'ionisation $[M_1+NH_4]^+$ du monolaurate de glucose. Le pic $m/z=544,5$ à l'ionisation $[M_2]^+$. Il correspondrait à un dilaurate de glucose. En effet, la masse molaire exacte du dilaurate de glucose, de formule brute $C_{30}H_{56}O_8$, est de $M_2=544$ g/mol.

La masse de l'ADBS est $M_{ADBS}=326,3$ g/mol. Un pic à $m/z=326,3$ est observé. Il correspond à $[M_{ADBS}]^+$. A $m/z=344,3$, correspond l'ionisation $[M_{ADBS}+NH_4]^+$ de l'ADBS.

L'analyse par spectroscopie de masse de la réaction entre le glucose et l'acide laurique permet de retrouver des masses molaires qui correspondent à celles du monolaurate de glucose et du dilaurate de glucose.

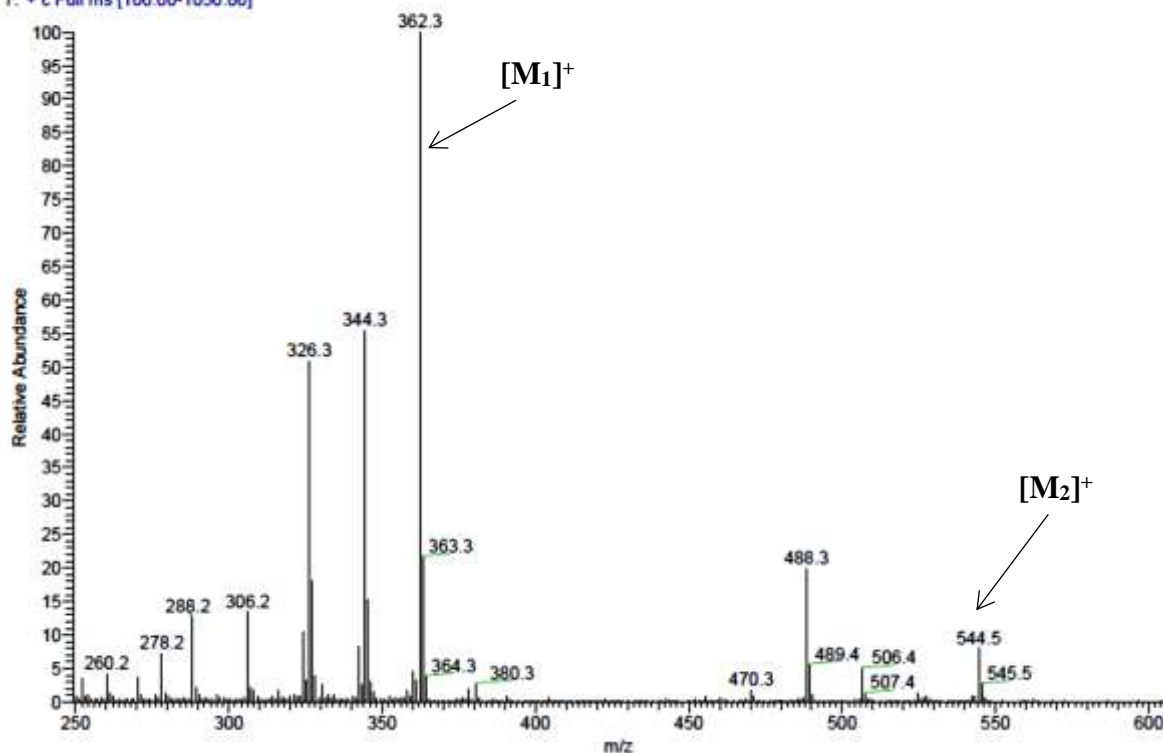


Figure IV-17 : Mise en évidence de la formation du laurate de glucose (ratio AL/Glc 1:1, en présence de 0,12 équivalent de l'ADBS, 80°C, 8h)

- **Caractérisation des constituants formés dans le milieu réactionnel obtenu de la réaction entre le glucose et l'acide myristique**

L'analyse a été réalisée sur un produit obtenu à partir de la réaction entre l'acide myristique et le glucose en présence de 0,06 équivalent d'ADBS (Figure IV-18).

Le monomyristate de glucose de formule brute $C_{20}H_{38}O_7$ possède une masse molaire de $M_3=390,5$ g/mol. Le pic à $m/z=180,0$ correspond à $[M_{Glc}]^+$ du glucose et le pic $m/z=246,2$ à l'ionisation $[M_{AM}+NH_4]^+$ de l'acide myristique. La molécule inconnue est ionisée à la masse $[M_3]^+$ correspondant au pic $m/z=390,2$ et à $[M_3+NH_4]^+$ correspondant au pic $m/z=408,3$. Ces deux pics sont attribuables au myristate de glucose. Le spectre de masse révèle aussi un pic ionisé $[M_4+NH_4]^+$ correspondant au pic $m/z=618,4$ attribuable à la masse molaire du dimyristate de glucose de formule brute $C_{34}H_{64}O_8$. On en déduit la formation du monomyristate de glucose en constituant majoritaire et celle du dimyristate de glucose.

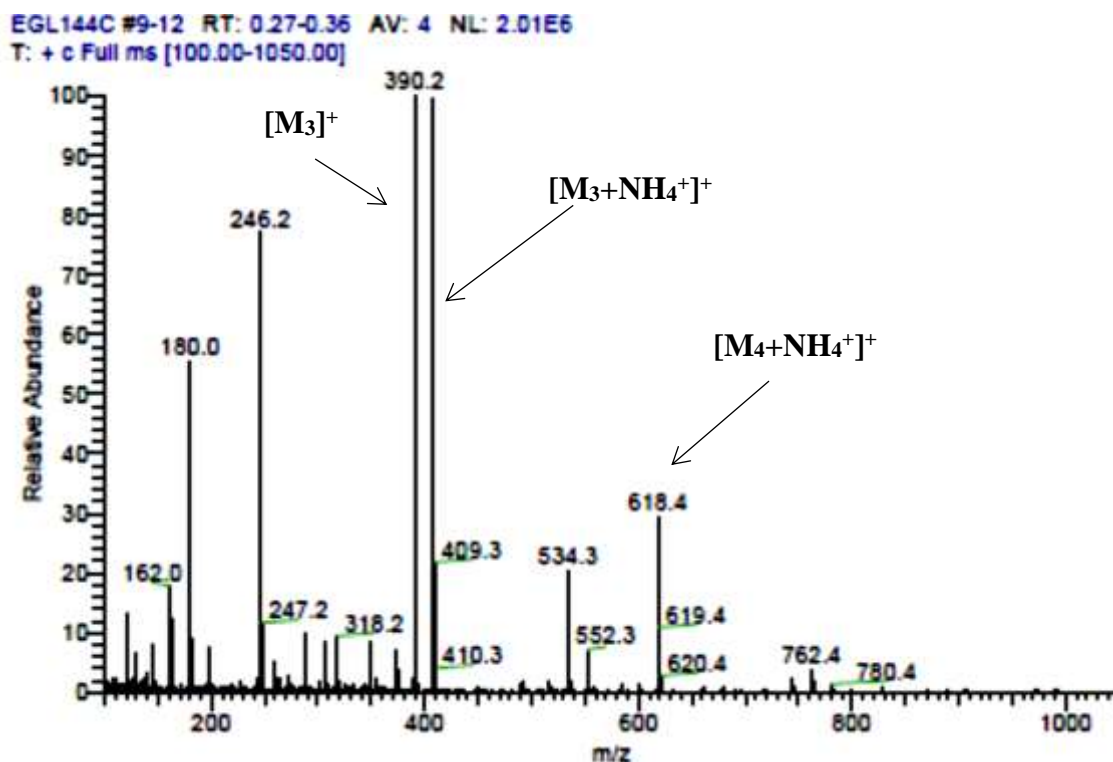


Figure IV-18 : Mise en évidence de la formation du myristate de glucose (ratio AL/Glc 1:1, 0,12 équivalent de l'ADBS, 80°C, 8h)

- **Caractérisation des constituants formés dans le milieu réactionnel obtenu de la réaction entre le glucose et les acides gras de *I. gabonensis***

La Figure IV-19 montre le spectre de masse du produit obtenu à partir de la réaction d'estérification entre les acides gras de *I. gabonensis* et le glucose. Les acides laurique et myristique sont les deux acides gras majoritaires dans le beurre et représentent 90 % de la composition en acides gras. Les masses molaires théoriques correspondantes respectivement au laurate de glucose ($m/z=362,3$) et au myristate de glucose ($m/z=390,2$) ont été détectées. Le pic $m/z=636,2$ correspond à l'ionisation du dimyristate de glucose $[M_4+N_2H_7]^+$. Le pic $m/z=664,4$ pourrait correspondre à l'ionisation du diester de glucose acylé avec un acide myristique et un acide palmitique $[M_5]^+$. La formation des esters de glucose et des acides laurique et myristique est ainsi mise en évidence tant pour le monolaurate de glucose, que pour le monomyristate de glucose, le dimyristate de glucose et le diester ayant une chaîne myristique et palmitique.

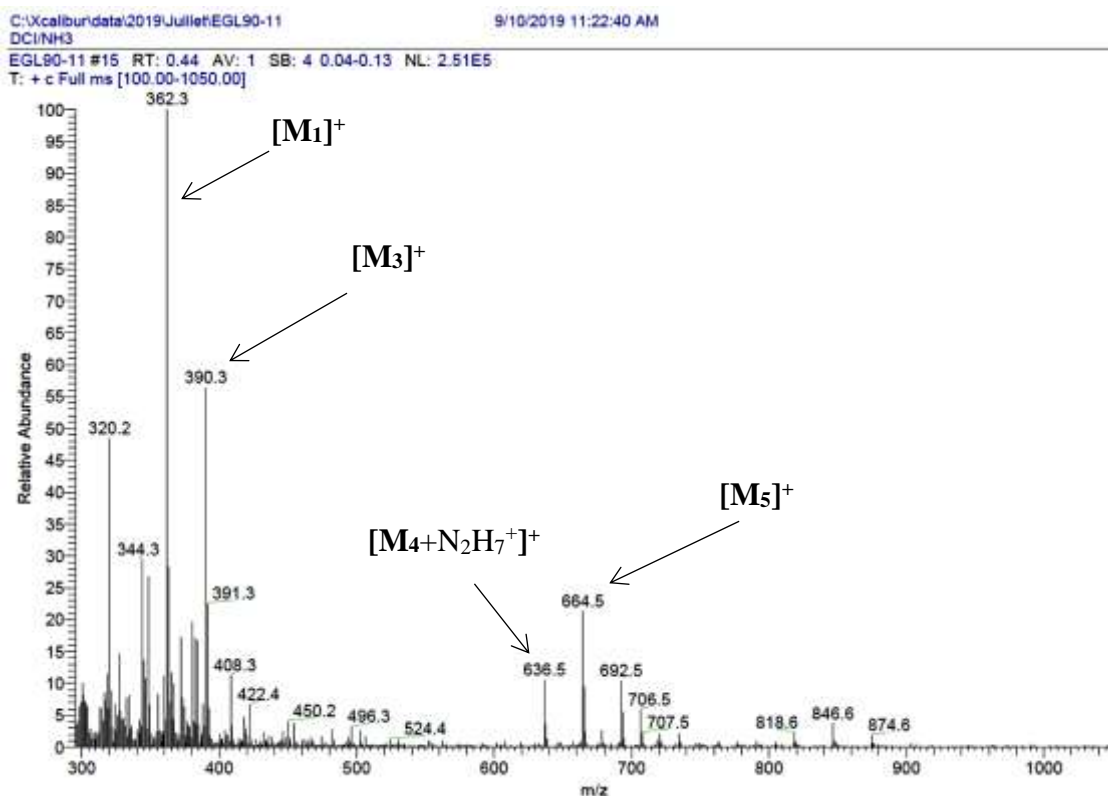


Figure IV-19 : Mise en évidence de la formation des esters de glucose de *I. gabonensis* (ratio AL/Glc 1:1, 0,06 équivalent de l'ADBS, 80°C, 8h)

b. Caractérisation des produits de la réaction entre le glucose et le mélange d'acides gras de *I. gabonensis* par IRTF

L'IRTF est approprié pour mettre en évidence la formation des liaisons esters des esters de sucre grâce à l'identification aisée des fréquences caractéristiques des chromophores de ces esters. En effet, la Figure IV-20. Le spectre rapporte avec l'apparition d'une bande intense entre 3600 et 3100 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation des O-H du glucose. Entre 3100 et 2800 cm^{-1} on retrouve les vibrations d'élongation de C-H. A 1744 cm^{-1} et 1710 cm^{-1} se trouvent respectivement les bandes d'absorption caractéristiques des vibrations d'élongation des liaisons C=O des esters formés et de l'acide carboxylique non réagi.

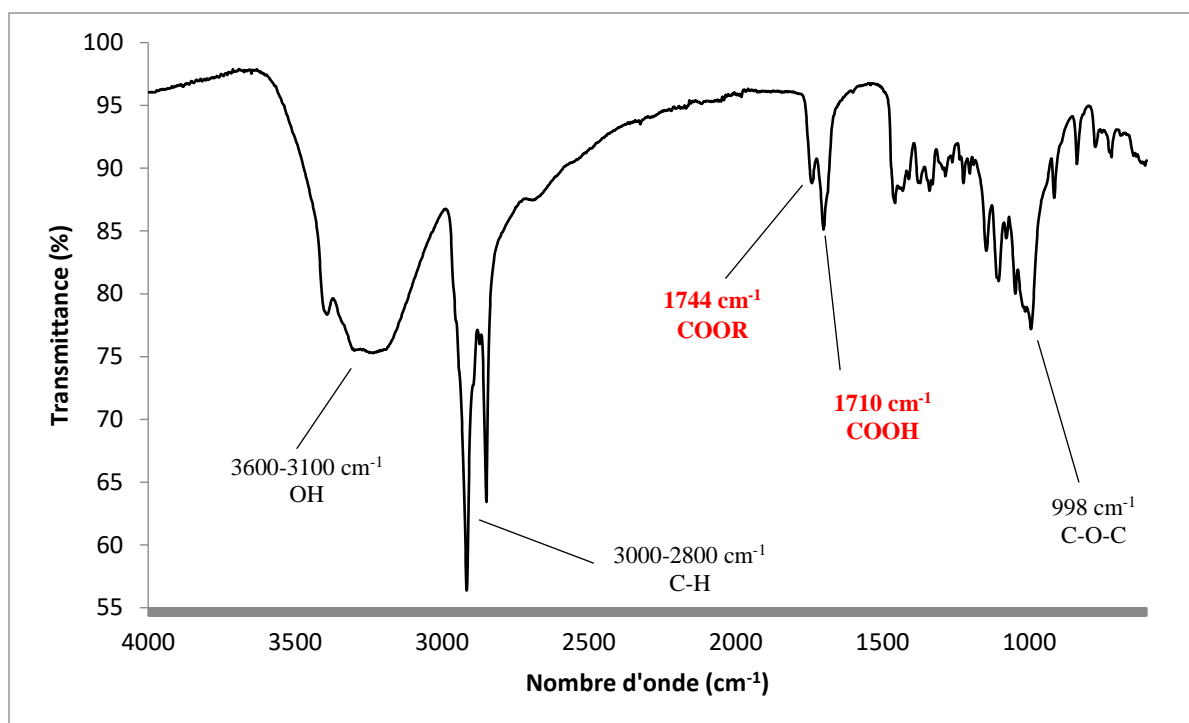


Figure IV-20 : Spectre IRTF du milieu réactionnel (ratio AM/Glc 1:2, 0,12 équiv d'ADBS, 80°C, 8h)

La Figure IV-21 montre le spectre IRTF du produit obtenu après purification du milieu réactionnel sur colonne de séphadex. Les bandes d'absorption de forte intensité correspondant aux vibrations d'élongations des liaisons O-H ($3600-3100\text{ cm}^{-1}$), C-H ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$), C=O (1740 cm^{-1}), C-O-C (1059 cm^{-1}) de l'éther cyclique et C-O (1156 cm^{-1}) des esters de sucre sont identifiées.

Que l'analyse infrarouge soit réalisée à partir du milieu réactionnel (Figure IV-20) ou à partir du produit purifié (Figure IV-21), des similitudes apparaissent au niveau des structures chimiques nouvelles identifiées correspondant aux ESAG avec des profils juxtaposables des vibrations d'élongations des groupes caractéristiques des esters de sucre. La réaction entre le glucose et le mélange des acides gras de *I. gabonensis* se traduit par la formation d'une liaison ester sans distinction entre les fréquences $\mu(\text{C}=\text{O})$ des groupes acyles de ces esters.

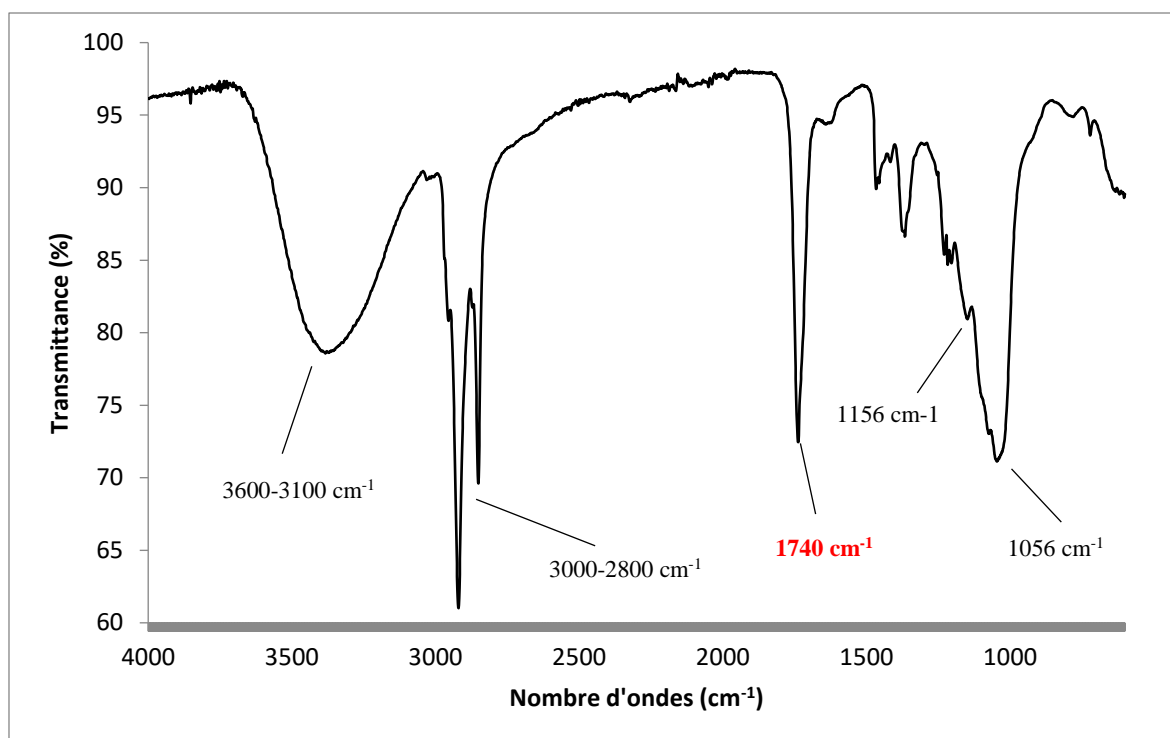


Figure IV-21 : Spectre IRFT du produit purifié sur colonne séphadex.

c. Caractérisation structurale par spectroscopie RMN des réactifs et produits

- Acides laurique et myristique

Les acides laurique et myristique sont des acides gras saturés dont les structures sont présentées à la Figure IV-22 à l'aide formules semi-développées. Les Figure IV-23 et la Figure IV-24 présentent respectivement les spectres des déplacements chimiques des protons et carbones de l'acide myristique dans de DMSO- d_6 .

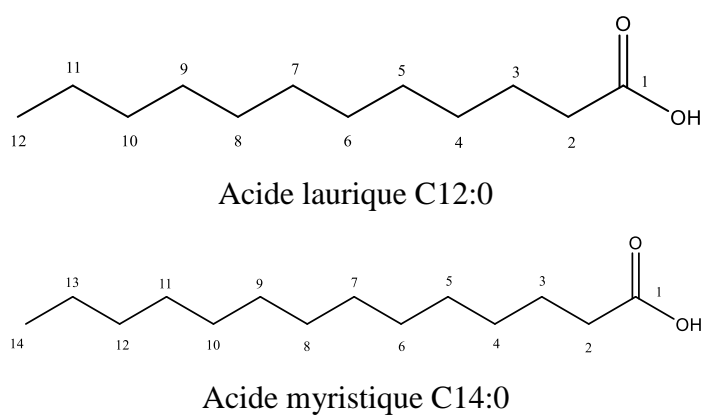


Figure IV-22 : Structures semi-développées des acides laurique et myristique

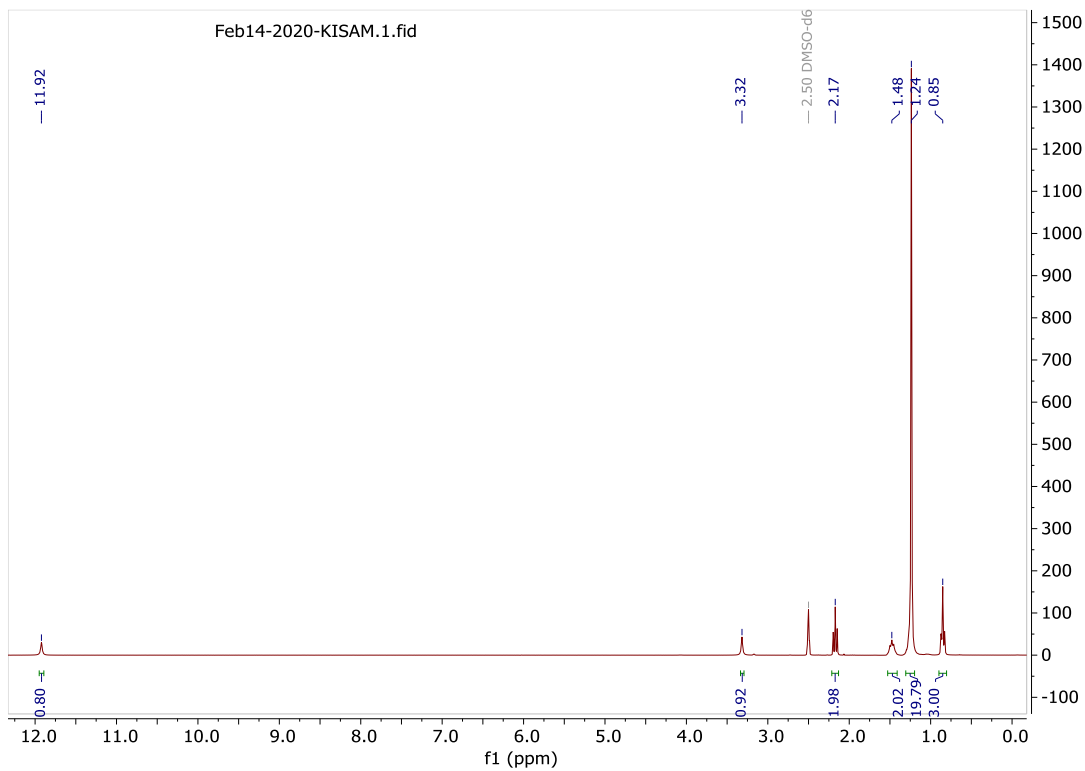


Figure IV-23 : Spectre ^1H RMN de l'acide myristique dans le DMSO-d_6

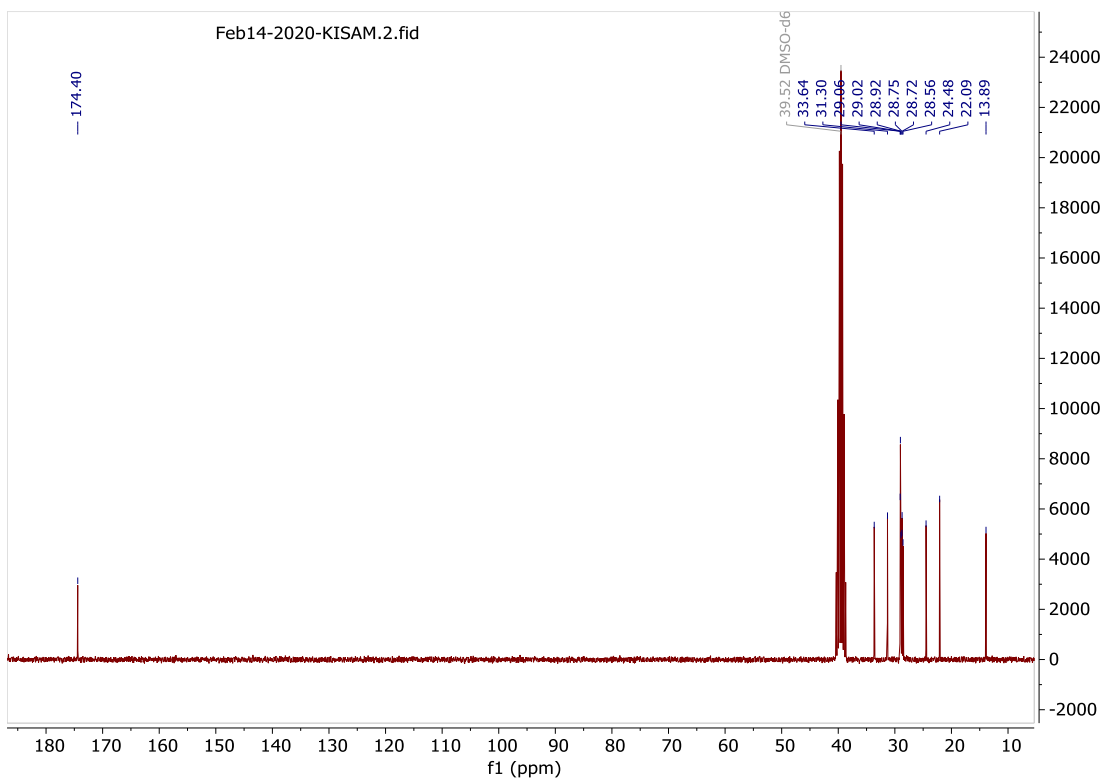


Figure IV-24 : Spectre ^{13}C RMN de l'acide myristique dans le DMSO-d_6

- **Caractérisation structurale par spectroscopie RMN du proton des constituants du milieu réactionnel de la réaction entre l'acide myristique et le glucose**

Le solvant utilisé est le DMSO-*d*₆ avec un déplacement caractéristique à 2,5 ppm. L'analyse du spectre montre une nette différence entre le triplet des hydrogènes en α de la fonction carboxylique et ceux du carbonyle de l'ester (Figure IV-26). L'observation d'un multiplet en α du carbonyle plutôt qu'un triplet montre qu'il s'est produit plus d'une acylation.

- **Caractérisation structurale par spectroscopie RMN du carbone des constituants du brut réactionnel de la réaction entre l'acide myristique et le glucose**

On identifie sur le spectre du carbone Figure IV-27 le pic à 174,8 ppm attribuable au carbone du carbonyle du groupe carboxylique de l'acide gras libre. Deux pics à 172,7 ppm et 173,6 ppm sont identifiés. Ils sont attribués aux carbones respectifs des deux esters de sucre formés. Cependant, les pics ne sont pas bien résolus pour déterminer le nombre d'acylation sur le glucose.

Les spectres HSQC (Figure IV-28) et HMBC (Figure IV-29) permettent de visualiser les corrélations entre les carbonyles et les protons de la molécule. Les déplacements chimiques des carbones des carbonyles à 172 ppm et 173 ppm sont respectivement liés aux protons à 2,30 ppm et 2,25 ppm en α du carbonyle. Ces carbonyles sont également liés aux protons en β du carbonyle.

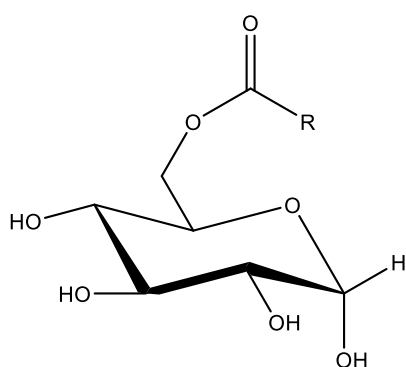
Des corrélations entre les déplacements chimiques des carbonyles et les zones d'acylation sur le glucose sont également présentes. Sur le spectre HMBC, des déplacements chimiques des carbonyles à 173 ppm sont liés à des hydrogènes à 4,30 (α) et 4,02 (β) ppm correspondant à une acylation sur le carbone en position 6 du glucose. En HSQC, ces protons sont liés à des carbones à 63,70 et 63,63 ppm. Une corrélation en HMBC entre le déplacement chimique d'un proton à 3,58 ppm et celui d'un carbone à 173,6 ppm suggère une acylation sur le glucose. En HSQC, le proton à 3,58 ppm est lié à un carbone à 64,2 ppm. Le carbone à 172,7 ppm est lié aux protons à 4,98 et 5,12 ppm. Ces protons sont liés aux carbones 103,8 et 104,9 ppm.

Le Tableau IV-9 présente les corrélations protons-carbones des esters obtenus.

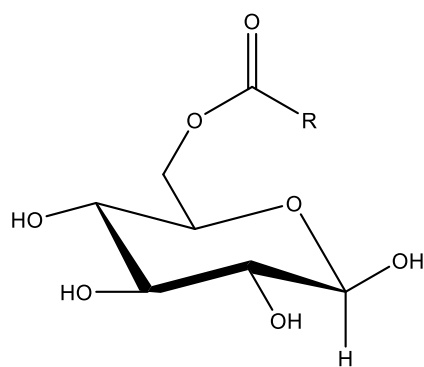
Tableau IV-9 : Déplacements chimiques de l'acide myristique et des esters de glucose

Acide myristique	Produit	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
	C1	4,98	103,8
		5,13	104,9
	C2-C5	2,9-5,6	60-105
	C6a, C6b	4,02	63,63
		4,30	63,70
		3,58	64,20
	-C=O (ester)		172,7
			173,6
	2H (-CH ₂ COO-glucose)	2,26	33,64
		2,33	33,88
	2H (-CH ₂ -CH ₂ -COO-glucose)	1,50	24,48
	16H (-CH ₂ -)	1,23	22,58-29,46
	3H (-CH ₃)	0,85	13,89
	-C=O (acide)		174,4
	2H (-CH ₂ COOH)	2,17	33,64
	16H (-CH ₂ -)	1,23	22,58-29,46
	3H (-CH ₃)	0,85	13,89

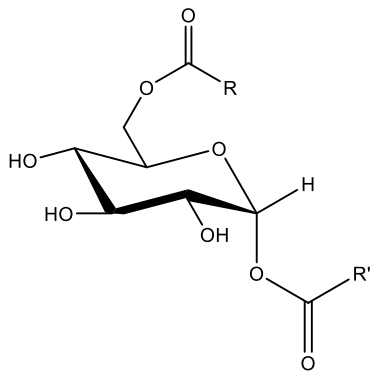
Forme α du monoester



Forme β du monoester



Forme α du diester



Forme β du diester

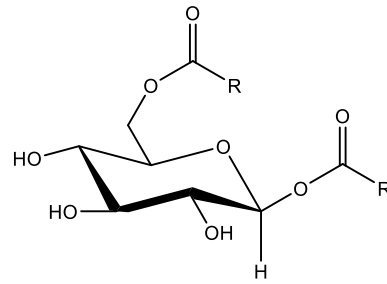


Figure IV-25 : Représentation des formes anomères α et β des mono- et diesters de glucose

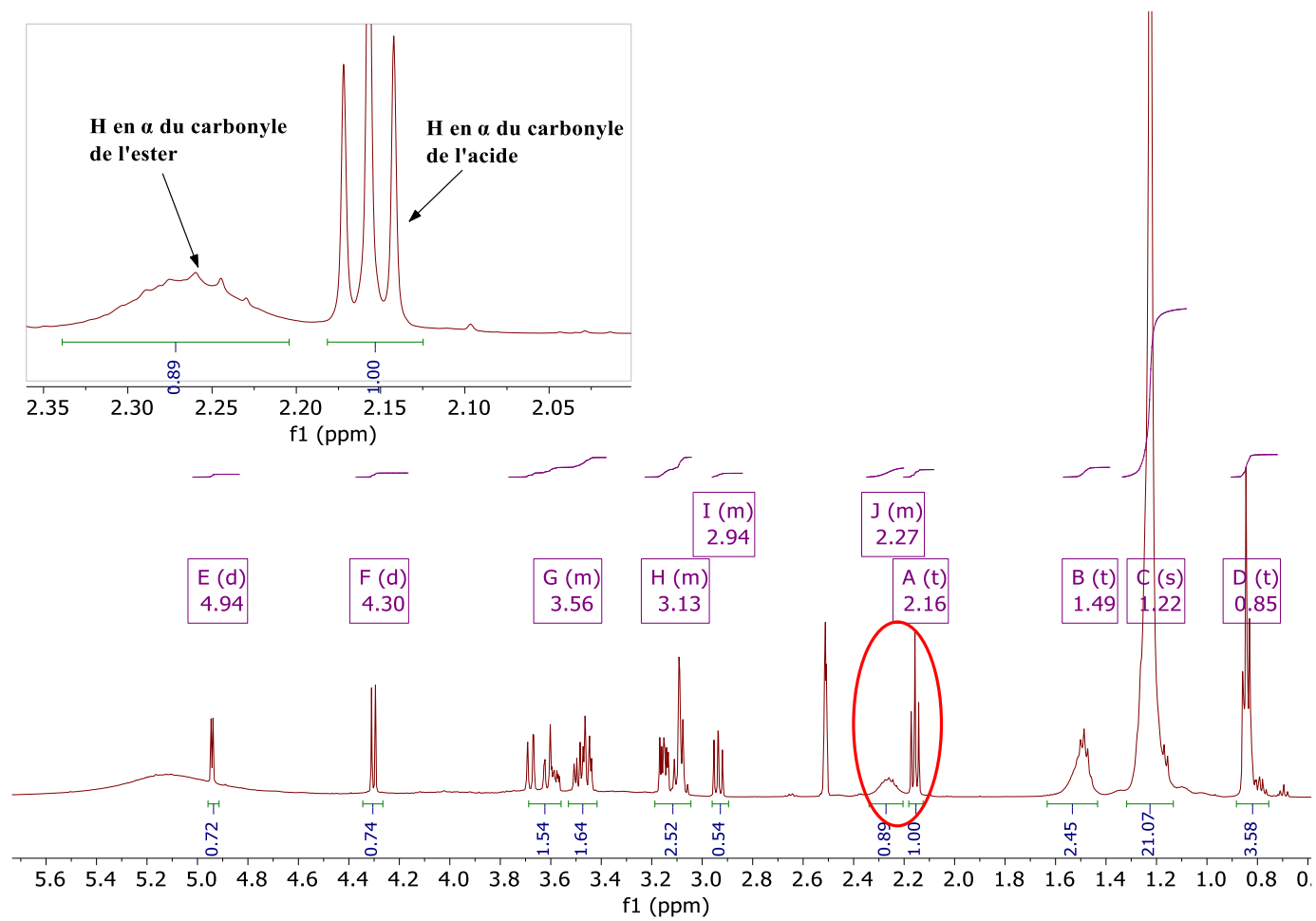


Figure IV-26 : Spectre ^1H RMN des constituants du brut réactionnel

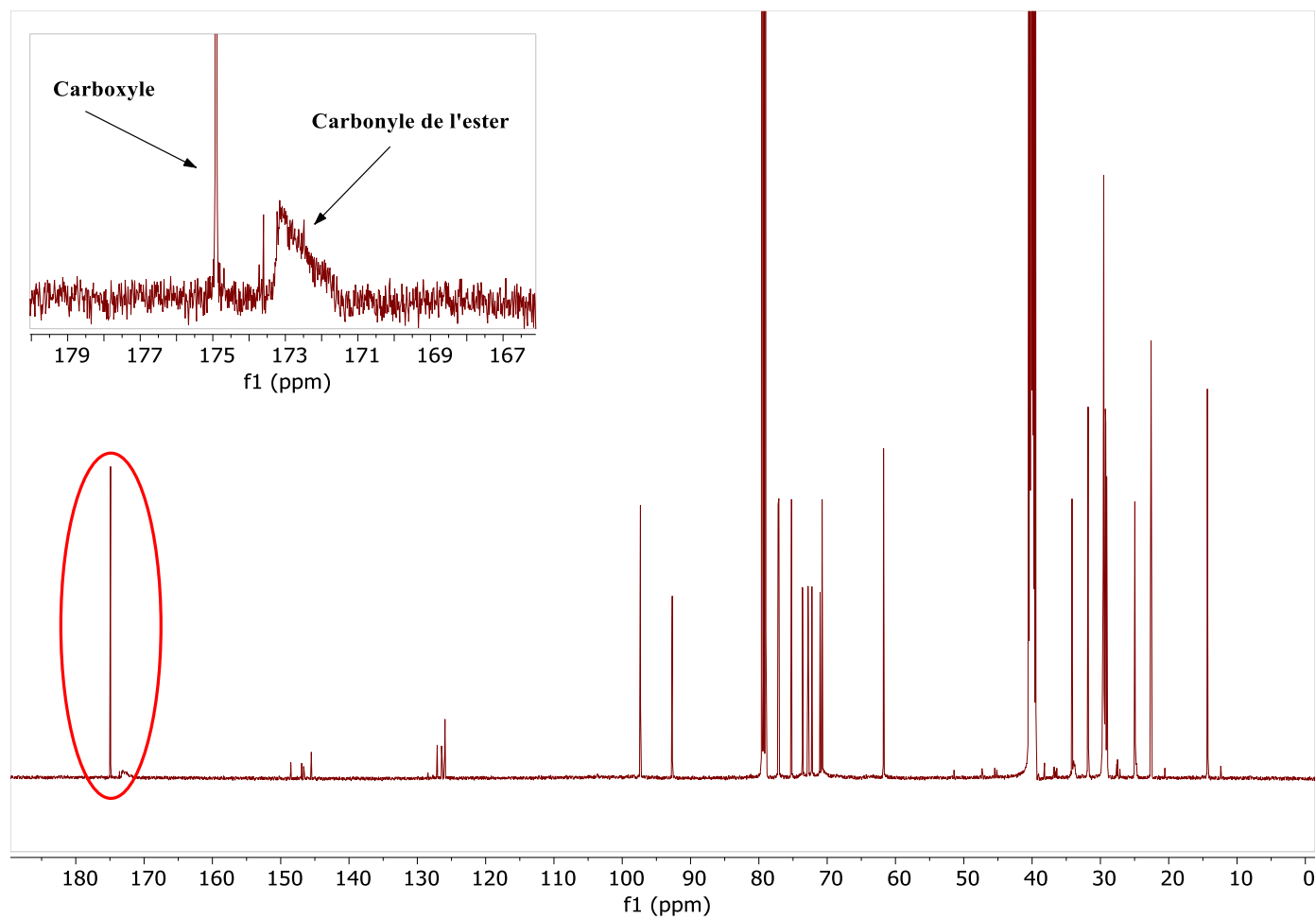


Figure IV-27 : Spectre ^{13}C RMN des constituants du brut réactionnel

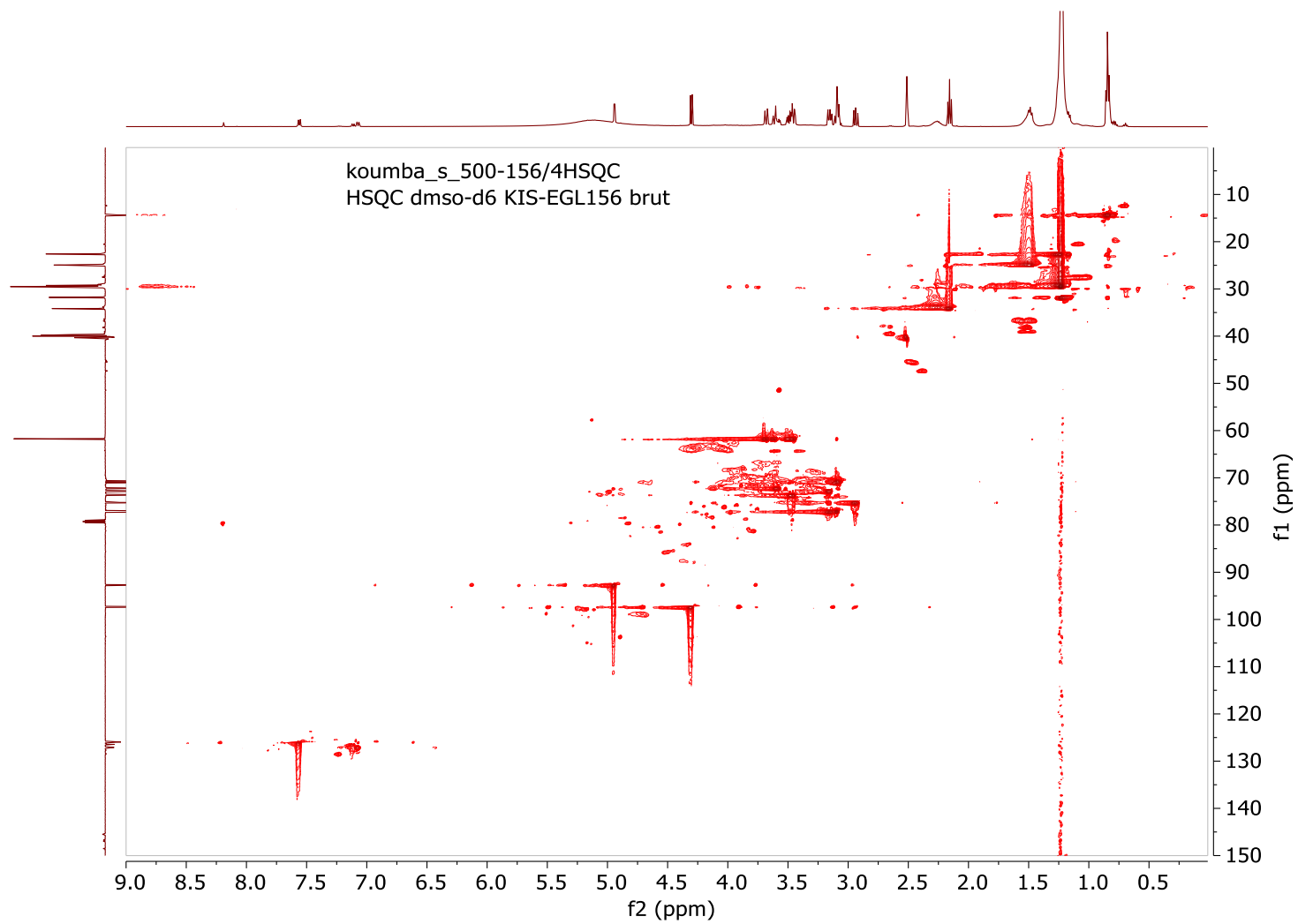


Figure IV-28 : Spectre HSQC des constituants du brut réactionnel

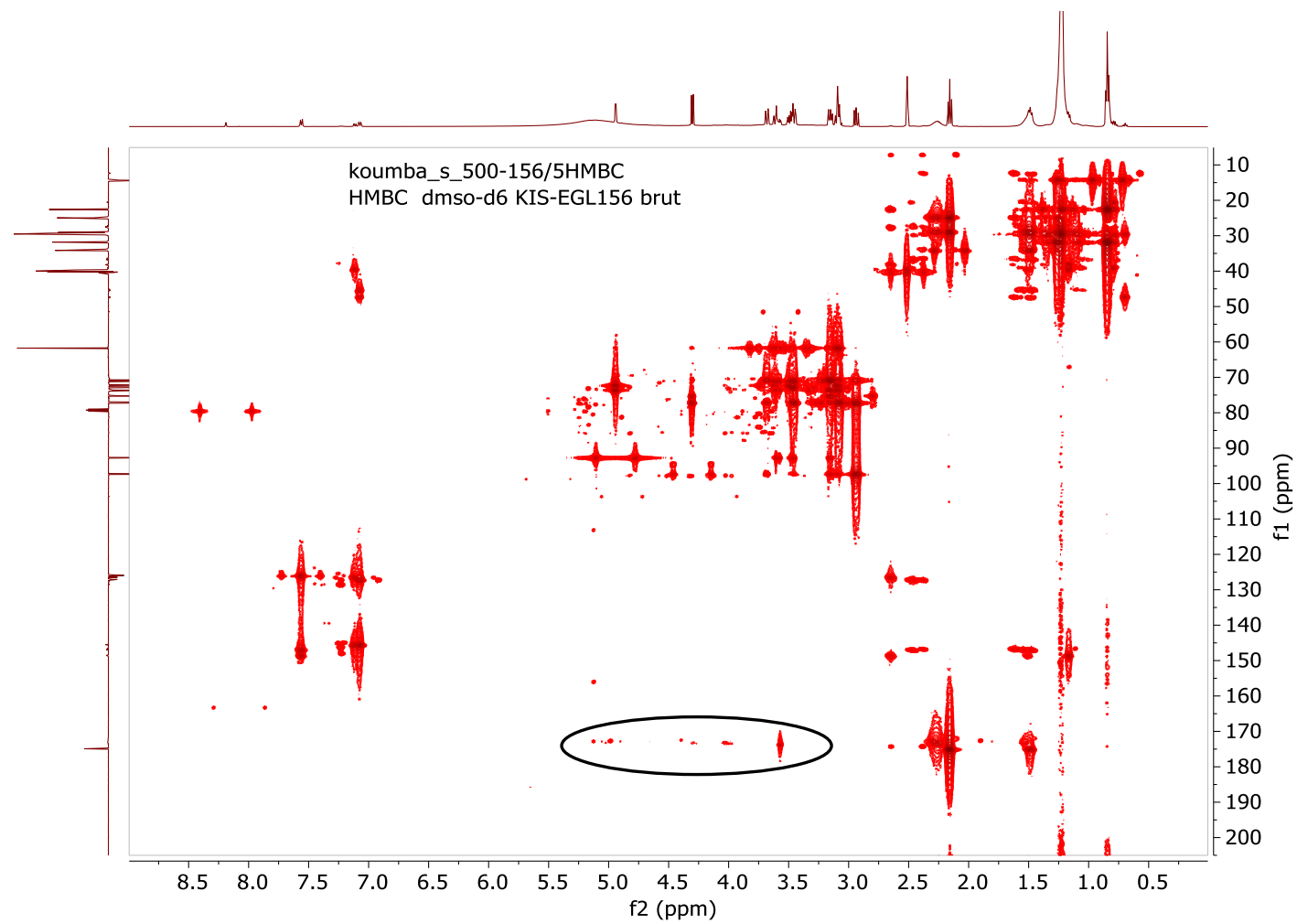


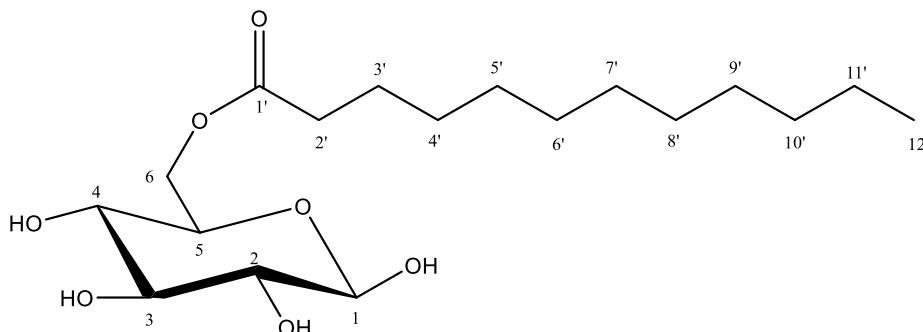
Figure IV-29 : Spectre HMBC des constituants du brut réactionnel

- **Structures possibles des esters de glucose**

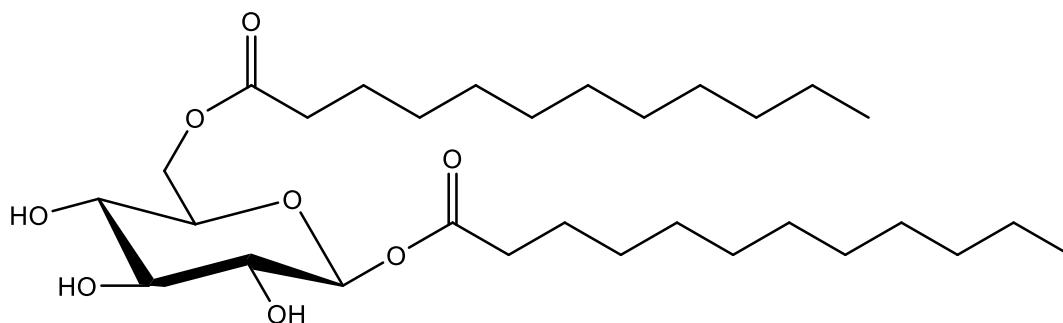
En combinant les résultats de spectrométrie de masse, IRTF et RMN, nous pouvons établir d'une part la formation des monoesters et des diesters de glucose des acides gras laurique et myristique mis en œuvre individuellement au cours de chacune des réactions d'estérification et d'autre part la formation de ces mêmes monoesters et diesters de glucose du mélange d'acides gras C12:0 et C14:0 accompagnée des monoesters mixtes de glucose mise en jeu dans le mélange d'acides gras de *I. gabonensis* en tant que réactif de la réaction d'estérification. Dans tous les cas, la monoacylation est bien prononcée. Elle est remarquable en cas de mélange d'acides gras C12:0/C14:0. En se référant aux définitions rappelées sur le degré de substitution, l'obtention de ces monoesters et diesters et esters mixtes milite en faveur d'un degré de substitution DS=1-2.

Dans le cas de l'acylation du glucose, nous avons obtenu une monoacylation de façon prépondérante et une diacylation du glucose. La spectroscopie de masse a été bien adaptée pour visualiser ces attributions structurales. Ainsi les structures possibles sont les suivantes (Figure IV-30) :

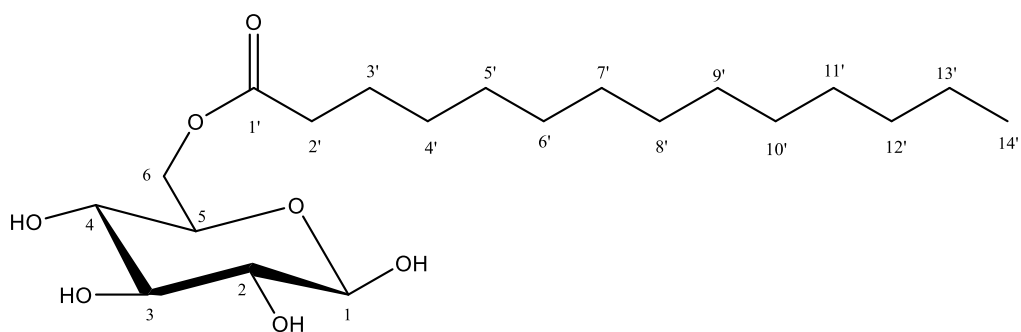
Monolaurate de glucose



Dilaurate de glucose



Monomyristate de glucose



Dimyristate de glucose

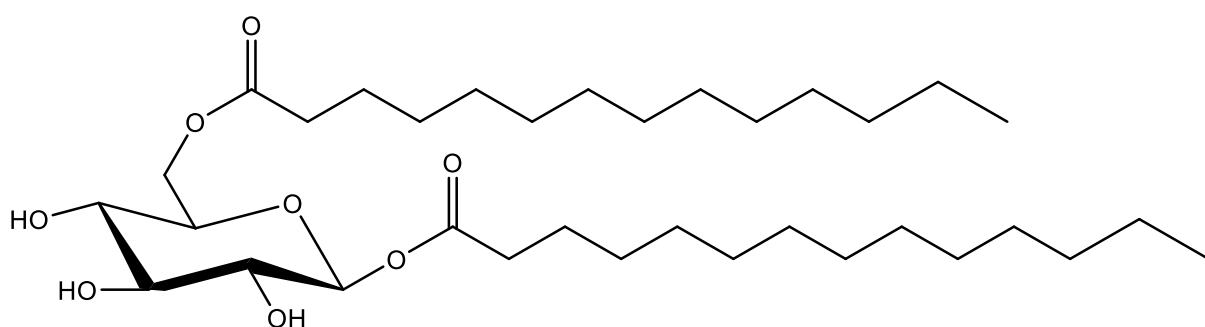


Figure IV-30 : Structures proposées pour les esters de glucose

IV.2.4. Etude des paramètres de la réaction

Méthode de détermination du rendement de synthèse

La réaction étudiée met en jeu les sites hydroxyles du glucose et les groupes acyles des acides laurique et myristique. Selon les interactions mises en évidence entre les protons H_{α} et H_{β} avec les carbones des groupes acyles des esters de glucose par HMBC ou HSQC on peut s'autoriser de proposer de décrire un des schémas théoriques de la réaction entre le glucose et les acides gras. Dans ce cas, l'hydroxyle primaire du glucose serait plus réactif que les hydroxyles secondaires du fait de leur accessibilité stérique. La réaction d'estérification entre les deux réactifs en présence d'ADBS peut s'écrire comme suit (Figure IV-31) :

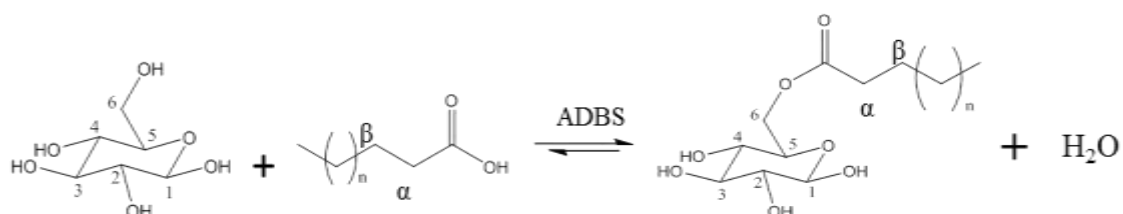


Figure IV-31 : Un des schémas théoriques de synthèse de l'ester de glucose

Les protons en α de la fonction carboxylique des acides gras présentent des déplacements chimiques différents de ceux en α des esters de glucose formés. Le rendement de synthèse des produits obtenus peut ainsi être calculé par RMN selon l'équation ci-après :

$$\%EGL = \frac{\text{integrale } H\alpha(E) \text{ ester}}{\text{integrale } H\alpha(A)\text{acide} + \text{integrale } H\alpha(E)\text{ester}}$$

$H\alpha(E)$ représente les protons en α de la fonction carbonyle de l'ester de déplacement chimique 2,31 ppm.

$H\alpha(A)$ les protons en α de la fonction carboxylique de l'acide gras de déplacement chimique 2,17 ppm.

a. Effet de la quantité de catalyseur

L'effet de la concentration en ADBS sur le rendement de synthèse des esters de glucose réalisée en système hétérogène a été étudié. Deux observations sont rapportées pour les réactions d'estérification réalisées entre le glucose et l'acide myristique dans un ratio 1/1. Pour 0,06 équivalent en ADBS, le rendement de synthèse est de 18,1% et pour 0,12 équivalent, le rendement est de 37,2%. En effet, lorsque la réaction est réalisée avec 0,06 équivalent d'ADBS sous agitation mécanique pendant 8h, le mélange à la fin est hétérogène et forme deux phases. Elles se solidifient à température ambiante. On distingue une phase contenant majoritairement le glucose solide n'ayant pas réagi et l'autre phase constituée de l'acide gras n'ayant pas réagi. Une analyse rapide par IRTF des phases solides révèle que le produit obtenu se répartit entre les deux phases. Et pour 0,12 équivalent en ADBS, le rendement est de 37,2%. En revanche le milieu réactionnel forme une seule phase. Elle se solidifie à température ambiante. Ces résultats montrent que l'augmentation de la quantité de catalyseur permet d'améliorer la surface de contact entre les réactifs et donc d'obtenir un meilleur rendement de synthèse. Une concentration optimisée en site sulfonique est nécessaire pour des meilleures performances en présence de l'ADBS. En effet, l'augmentation de la quantité de catalyseur interviendrait à plusieurs niveaux au cours du processus réactionnel :

- le nombre de micelles formées par le catalyseur dans le milieu serait plus densifié. Ce qui favoriserait la solubilisation des réactifs notamment le glucose et augmenterait la surface de contact des réactifs.
- les réactifs s'auto-assemblent autour du catalyseur de nature amphiphile. Son groupe de tête sulfonique hydraté agrège les groupes polaires carboxyliques des acides gras et hydroxyles des sucres par des interactions de type H et de type donneur-accepteur entre les groupes donneur et accepteur d'acyles. Il semble que les interactions observées entre les protons en C1 et C6 des hydroxyles du glucose et les carbonyles augurent du contrôle de la régiosélectivité de la réaction d'estérification par ces objets. Les parties hydrophobes créent des coques hydrophobes participant à la formation d'objets organisés.
- le transfert de matière se produirait ainsi de façon plus efficace.

b. Effet du rapport molaire

Le Tableau IV-10 montre les rendements de synthèse obtenus en fonction du rapport molaire. Le rapport molaire entre l'acide myristique et le glucose a été étudié pour une quantité de catalyseur de 0,12 équivalent à 80°C pendant 8h à 500 rpm. Les ratios molaires 1/1, 1/2 et 1/3 ont été étudiés. Pour les ratios 1/1 et 1/2, les rendements de synthèse étaient respectivement de 37,2 % et 47,8 %. Ainsi pour un ratio molaire 1/2, le glucose est en excès par rapport à l'acide myristique et la réaction est favorisée dans le sens de l'obtention de l'ester.

Tableau IV-10 : Rendement de synthèse en fonction du rapport molaire

AG/Glucose	Système réactionnel	Rendement (%)
1/1	Homogène	37,2
1/2	Homogène	47,8

c. Effet de la méthode d'agitation

La méthode d'agitation est un paramètre important qui favorise la mise en contact des réactifs immiscibles. L'agitation mécanique, la cavitation ultrasonore et l'agitation à l'ultraturrax ont été testés comme moyens de cisaillement des réactifs dans ces milieux (Figure IV-32). La sonde à ultrasons utilisée a une longueur de 18 cm et un diamètre de 12 mm. Les essais ont été réalisés à une amplitude de 60 % et une pulsation de 5s on/20s off. L'ultraturrax utilisé a une longueur

de 11 cm et un diamètre de 9 mm. Les essais ont été réalisés à 15000 rpm. L'agitation mécanique a été réalisée avec une pale de 11 cm de long à 500 rpm.

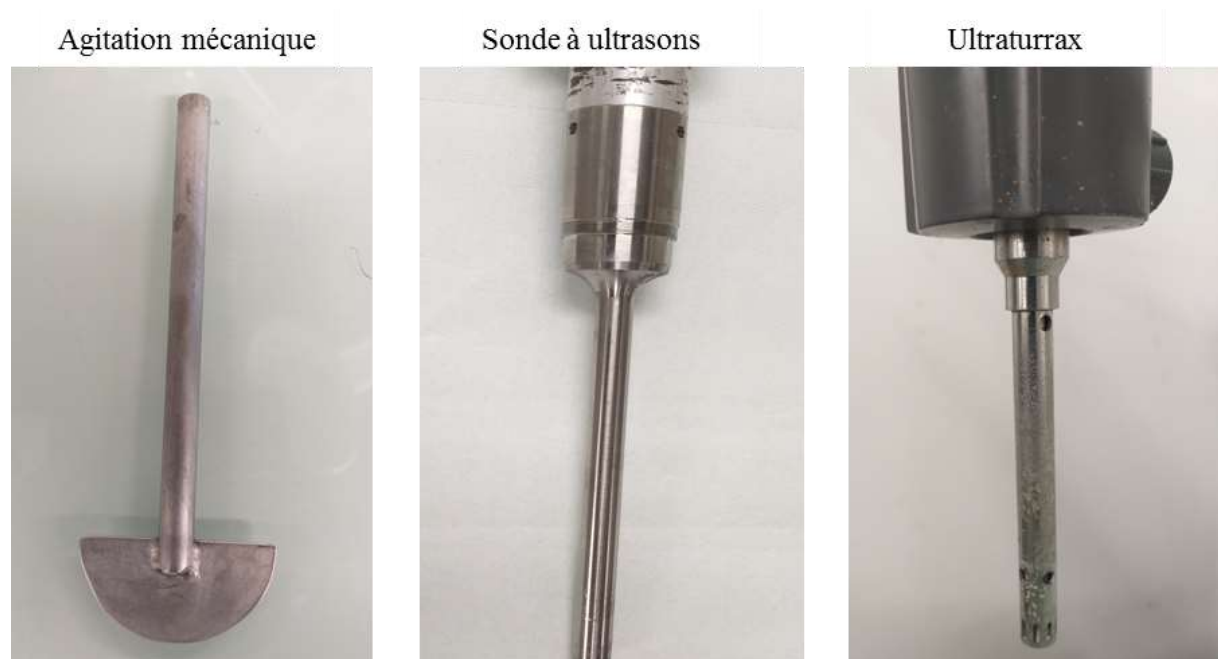


Figure IV-32 : Agitateurs utilisés pour les réactions d'estérification

Le Tableau IV-11 montre les rendements de synthèse des esters en fonction de la méthode d'agitation. Il a été observé que pour une quantité de catalyseur de 0,06 équivalent, le brut réactionnel est hétérogène en agitation mécanique. Nous avons ainsi pensé que l'utilisation d'une sonde à ultrasons ou de l'ultraturrax, permettrait de favoriser le contact entre les réactifs. Dans ces conditions (0,06 équivalent d'ADBS, agitation US et ultraturrax), les ultrasons et l'ultraturrax permettent d'obtenir un système homogène à la fin de la réaction mais le rendement de synthèse n'est pas amélioré. A 0,12 équivalent, la réaction à l'ultraturrax donne un rendement de 29,8% et celle avec la sonde à ultrasons donne un rendement de 20,2%. L'agitation mécanique avec pôle est plus appropriée pour réaliser efficacement le cisaillement des particules dans le milieu organisé. L'augmentation de la vitesse par agitation par ultraturrax ne permet pas d'augmenter le rendement de synthèse. Il est de même pour la cavitation ultrasonore.

Tableau IV-11: Rendement de synthèse des esters de glucose selon la méthode d'agitation

Agitation	Paramètres	Rendement (%)
AM	Ratio AcM/Glc 1/1, 0,12 équiv., 8h, 500 rpm, 80°C	37,2
ULT	Ratio AcM/Glc 1/1, 0,12 équiv., 8h, 15000 rpm	29,8
US	Ratio AcM/Glc 1/1, 0,12 équiv., 8h, 60%, 5s/20s	20,2

d. Effet du type d'acide gras

Nous avons réalisé des essais d'étude de la réaction d'estérification avec chacun des acides gras laurique C12:0 et myristique C14:0 puis avec le mélange de ces acides gras de *I. gabonensis*. Les réactions ont été réalisées par agitation mécanique à 500 rpm dans un ratio AG/Glc de 1/2, à 80°C pendant 8 h. La Figure IV-33 montre les résultats obtenus en fonction de la nature des acides gras.

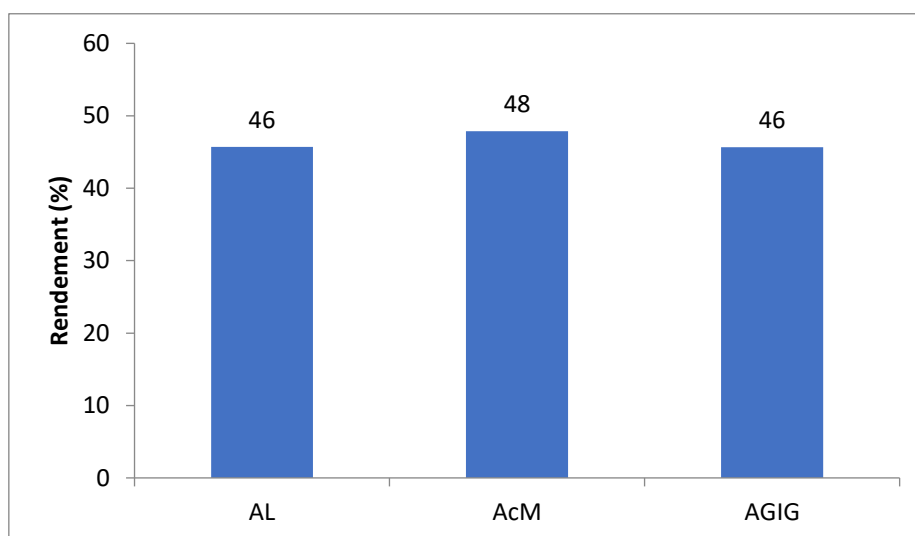


Figure IV-33: Rendement de synthèse d'esters de glucose en fonction de la nature de l'acide gras

Les rendements en esters de glucose et d'acides gras à chaînes courtes sont de l'ordre de 46-48%. Ils sont quasi-identiques. Ces résultats peuvent suggérer que les acides laurique et myristique réagissent de façon similaire individuellement ou sous forme de mélange des acides gras de *I. gabonensis*.

IV.2.5. Purification des esters de glucose et d'acides gras à chaînes courtes

La purification sur séphadex (séphadex LH-20, 25-100 μm) permet de séparer les composés d'un mélange réactionnel en fonction de la masse molaire. Elle est réalisée sur colonne séphadex en utilisant le mélange dichlorométhane/méthanol (1/1 : v/v) comme solvant. Lorsque le brut réactionnel est dissout dans le solvant, le glucose n'ayant pas réagi précipite et est récupéré et recyclé dans un autre essai. Le système à purifier est alors constitué de l'acide gras n'ayant pas réagi, des esters de glucose, de l'ADBS. Pour 1 g de milieu à purifier de l'expérience obtenue par réaction du glucose et de l'acide myristique en présence de 0,12 équivalent de ADBS (rendement de 48 %), une masse de $0,398 \pm 0,003$ g de sucre est éliminée. Une masse moyenne de $0,291 \pm 0,030$ g d'esters de glucose est récupérée. L'acide myristique est récupéré avec une masse de $0,257 \pm 0,030$ g pollué par le catalyseur ADBS. Par chromatographie sur couche mince CCM (Figure IV-34), la séparation des constituants est poursuivie en utilisant le mélange méthanol/chloroforme 1/4 (v/v) en tant qu'éluant. La révélation des constituants sur plaque CCM est réalisée au permanganate de potassium. Les premiers composés à sortir de la colonne sont les esters de glucose respectivement les monoesters à $R_f = 0$ et les diesters à $R_f = 0,47$. On remarque que l'ADBS sort à $R_f = 0,13$ bien distinct de l'acide myristique dont le $R_f = 0,73$. Il en résulte le raffinage intégral des constituants du milieu issu de la réaction d'estérification du glucose et des acides gras à chaînes courtes en milieu organisé. Des échantillons standards de chacun des groupes d'esters de glucose peuvent

être préparés avec succès par cette approche intégrée qui couple la séquence de synthèse et la séquence de purification sur séphadex et la séquence de séparation par CCM.

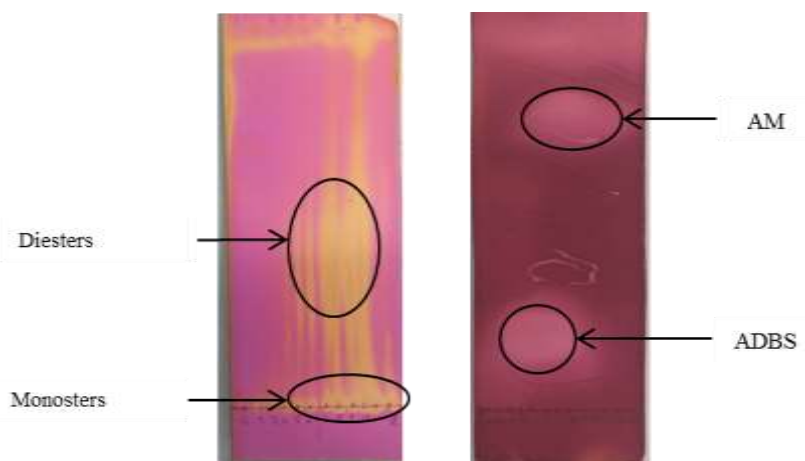


Figure IV-34 : Séparation par CCM du système concentré issu de la purification des esters de glucose réalisée sur colonne séphadex.

IV.2.6. Propriétés physiques et physico-chimiques des esters de glucose et d'acides gras en C12:0, C14 :0 et en mélange C12:0/C14 :0

a. Tension de surface (TS) et concentration micellaire critique (CMC)

La CMC est déterminée à partir de la courbe de la tension de surface en fonction de la concentration. Il existe une corrélation entre la longueur de la chaîne grasse et la tension de surface des composés (200). La Figure IV-35 montre les courbes de tension de surface des produits obtenus ainsi que celle de l'olivem 1000 qui est un émulsifiant commercial contenant de l'oliveate de sorbitan et de cétéaryl oliveate. L'oliveate de sorbitan est constituée d'une base oléique de l'huile d'olive C18:1 estérifié avec le sorbitan (un sucre) et de l'alcool cétéaryl C16:0/C18:0. Ainsi, il se présente ici une opportunité de comparer les propriétés des esters d'alcools gras commerciaux des huiles oléiques C18:1 versus esters de sucre de beurres lauriques C12:0/ C14:0.

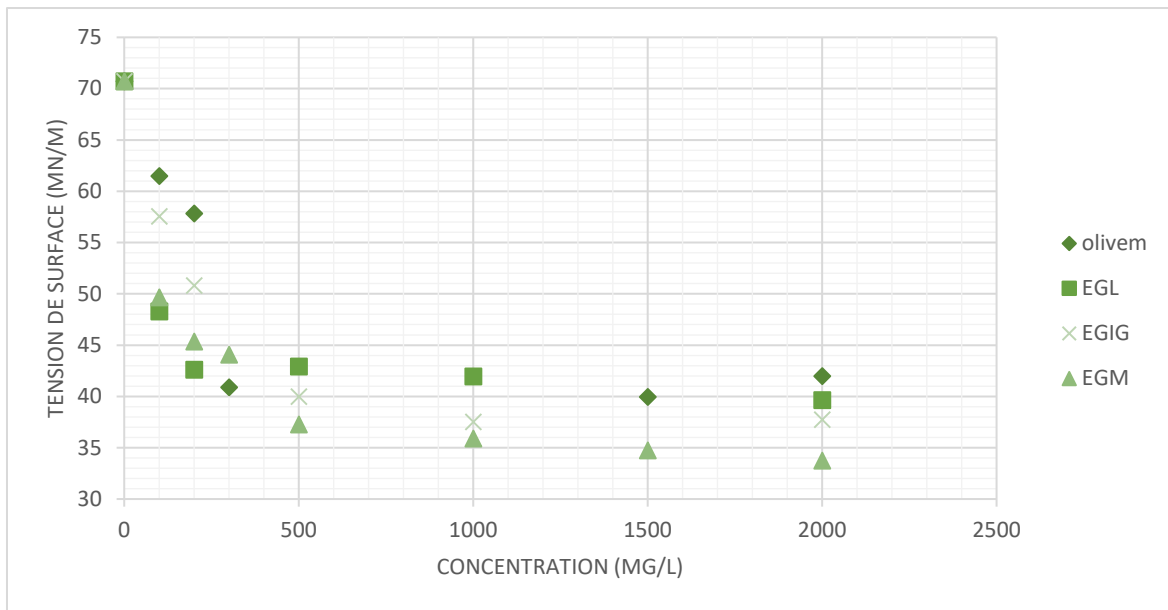


Figure IV-35 : courbes de la tension de surface en fonction de la concentration en ester de glucose

Le Tableau IV-12 regroupe les valeurs obtenues pour la tension de surface et la CMC de chaque composé. Les courbes de tension de surface de tous ces esters de glucose suivent la même allure avec une hyperbole qui se rompt à des concentrations différentes. Ce qui permet de déterminer leur CMC à chacune de ces concentrations. On détermine respectivement pour :

- i) le laurate de glucose à la CMC de 0,15 G/L une TS de 42 mN/m ;
- ii) le myristate de glucose à la CMC de 0,25 G/L une TS de 38 mN/m ;
le mélange des esters de glucose d'acides gras C12 :0 / C14 :0 à la CMC de 0,30 G/L une TS de 40 mN/m ;
- iii) l'Olivem 1000 à la CMC de 0,30 G/L une TS de 40 mN/m.

On peut remarquer que les tensions de surface des différents esters de glucose à base de chaînes grasses courtes C12:0 et C14:0 sont proches entre elles. Elles sont également proches de la valeur de l'émulsifiant commercial à base d'acyle en chaîne grasse moyenne C18:1 acylées avec un mélange 'alcools saturés C16:0/C18:0. De plus, la tension de surface des esters de glucose des acides gras de *I. gabonensis* est comprise entre celle du laurate de glucose et du myristate de glucose. Les TS de ces esters reflètent le compromis des propriétés engendrées par les chaînes acyles lauryle et myristyle du beurre laurique de *I. gabonensis* riche en C14:0. Sefha et al. ont obtenu une tension de surface de 41 mN/m et une CMC de 0,1 g/L pour le palmitate

de glucose. Les résultats de notre étude viennent s'ajouter à la liste des esters de sucre utilisables dans des applications industrielles.

Tableau IV-12 : Tension de surface et CMC des esters de glucose

Produit	CMC (g/L)	TS (mNm)
Laurate de glucose (EGL)	0,15	42
Myristate de glucose (EGM)	0,25	38
Esters de <i>I. gabonensis</i> (EGIG)	0,30	40
Olivem 1000	0,30	40

b. Indice de stabilité des émulsions

L'indice de stabilité a été déterminé afin de montrer la capacité des esters de glucose obtenus à stabiliser les émulsions. Une valeur élevée de l'indice de stabilité indique une stabilité élevée de l'émulsion. Un système huile de colza dans eau contenant 0,5% en masse d'ester de glucose en solution aqueuse a été utilisé. La Figure IV-36 présente les indices de stabilité (ISE) du myristate de glucose (EGM), des esters de glucose de mélange d'acides gras laurique/myristique C12:0/C14:0 du beurre de *I. gabonensis* (EGIG) et de l'émulsifiant commercial Olivem 1000. Les valeurs des ISE des esters de glucose sont supérieures à celle obtenue pour le blanc (le blanc est composé uniquement d'huile est d'eau dans un ratio massique 1/10) ne contenant pas d'ester. En comparaison entre les produits, les valeurs des indices de stabilité obtenus pour l'Olivem 1000 à base d'acyle en C18:1 et de sorbitan couplé avec un mélange d'alkyles C16:0/C18:0 (ISE=143,87±0,03) et pour les esters de glucose en mélange de C12:0/C14:0 (ISE=143,68±0,01) sont quasi-identiques. Elles sont supérieures à celle de ISE du myristate C14:0 de glucose (ISE=135,64±0,01). Il est très difficile d'établir une relation entre la longueur de chaîne grasse et les valeurs de ces ISE. Les produits ne se distinguent pas particulièrement.

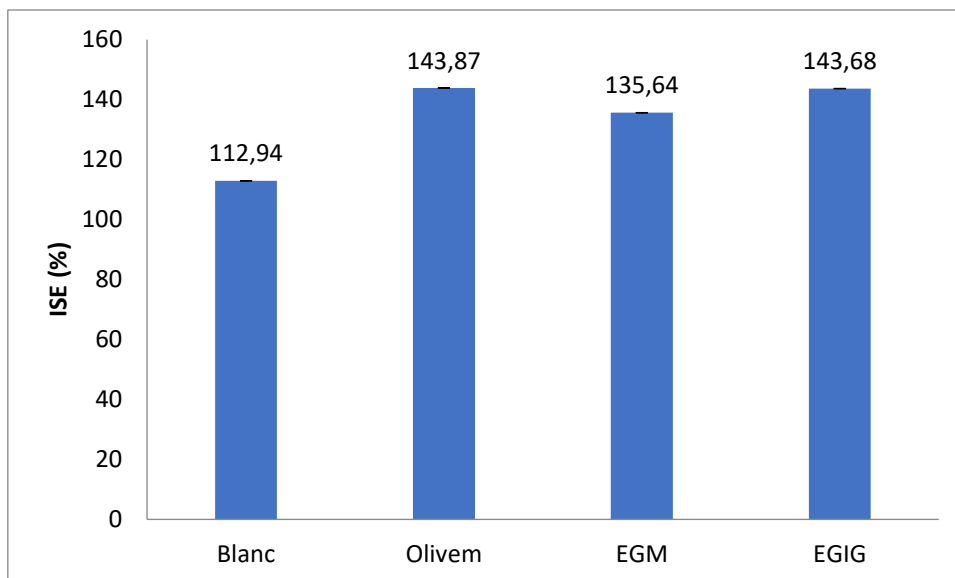


Figure IV-36 : Indice de stabilité des émulsions des esters de glucose en comparaison avec l'olivem 1000

Conclusion

Dans les réactions d'estérification étudiées, la mise en œuvre des réactifs hydrophiles comme le glucose avec les réactifs hydrophobes comme les acides gras laurique, myristique ou en mélange pose le verrou de l'immiscibilité entre ceux-ci. Ils créent des systèmes hétérogènes. Nous avons surmonté cette difficulté en ajoutant l'acide dodécylbenzène sulfonique dans le milieu. Il est utilisé en tant que tensioactif et catalyseur. En présence de l'eau structurée apportée par l'ADBS et produite *in situ*, il se crée des systèmes organisés *in situ*. Des pseudo-phases homogènes sont obtenues entre les acides gras et l'ADBS dans lesquelles le glucose solide est compatibilisé. L'ADBS semble diriger l'ensemble du système réactionnel. Le rapport molaire, la quantité de catalyseur et le mode d'agitation sont autant de paramètres à prendre en compte pour favoriser la mise en contact des réactifs dans le procédé de synthèse des esters de glucose avec des bons rendements en esters de glucose

La longueur de la chaîne des acides gras en 12 et 14 atomes de carbone n'a pas révélé une différence significative dans les rendements en esters de glucose obtenus.

La caractérisation des esters de glucose par spectrométrie de masse, IRTF et RMN ^1H et ^{13}C a permis de mettre en évidence la présence de monoesters et diesters de glucose dans le milieu et dans un produit isolé par la séquence de séparation par colonne séphadex suivie de la séparation

par CCM. A ce stade de l'avancement de nos travaux, nous ne sommes pas en mesure de donner des précisions sur la répartition massique ou en pourcentage entre les teneurs en monoesters et diesters de glucose. Nous avons identifié et caractérisé formellement ces deux familles d'esters de glucose ainsi que des esters de glucose mixtes dans le cas de la mise en jeu de mélange d'acides gras de *I. gabonensis*. Ces esters de sucre sont de degré de substitution de 1-2. Ce sont des produits recherchés dans diverses applications. Les résultats de nos premiers essais sur l'évaluation des propriétés tensioactives, des CMC et des indices de stabilité des émulsions sont très encourageants. Il en ressort que les valeurs obtenues sont proches de l'émulsifiant commercial Olivem 1000 pris comme référence. Ce dernier est un émulsifiant et épaississant puissant non allergénique largement utilisé en cosmétique. Les esters de glucose de C12:0, les esters de glucose de C14:0 et les esters de glucose du mélange d'acides gras C12:0/C14:0 ayant des propriétés équivalentes sont promis à un avenir dans les applications couvertes par l'Olivem 1000 en cosmétique.

IV.3. Cas d'étude exploratoire de réaction d'estérification du mucilage avec les acides gras à chaînes courtes en C12:0, C14:0 et en mélange C12:0 et C14:0

IV.3.1. Estimation du nombre d'hydroxyle du mucilage

La composition du mucilage en sucres acides et des sucres alcools neutres des mucilages issus des essais Muc-030-20 et Muc-017-50 a été déterminée au chapitre 3. Le Muc-030-20 est composé de 51 % de sucres acides et 49 % sucres alcools neutres. Muc-017-50 est composé de 35 % de sucres acides et 65 % de sucres alcools neutres. Les sucres-acides sont principalement des acides uroniques. La masse molaire des acides uroniques est de 194 g/mol. Le mucilage est composé de plusieurs monosaccharides constitués des sucres-alcools neutres dont les masses molaires varient entre 150 à 180 g/mol. L'estimation du nombre d'hydroxyles dans le mucilage, va être réalisée à partir d'une unité de glucose dont la masse molaire est de 180 g/mol.

Les polysaccharides acides des graines de lin (201) sont de la forme rhamnogalacturonan et ceux de la graine de cameline de la forme gal-rhamnogalacturonan (202). Les polysaccharides neutres du mucilage de lin sont de la forme galactoarabinoxylan (203). Les branchements au niveau de ces différentes formes de polysaccharides varient en fonction des sources de mucilage.

Le mucilage de chia serait constitué d'une chaîne principale et du branchement d'une unité de monosaccharides selon Lin et *al.* (51) (Figure IV-37). Cependant, les études réalisées par Hernandez et *al.* et Timilsena et *al.* (44,46) de même que les résultats que nous avons obtenus sur la composition en monosaccharides montrent que la structure des polysaccharides est plus complexe.

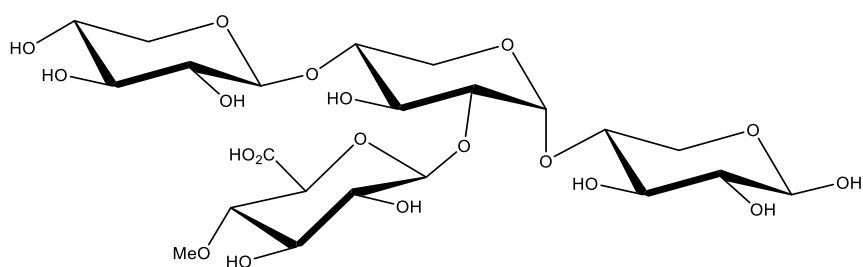


Figure IV-37: Représentation de l'unité de base des polysaccharides du mucilage de chia selon Lin et *al.* (51).

En considérant ces différentes structures, pour un monosaccharide, il y aurait au plus 3 à 4 hydroxyles libres. Ces derniers peuvent subir une estérification en présence d'acides gras. A

partir de la masse molaire du mucilage, la masse molaire du glucose et de l'estimation du nombre d'hydroxyles libres par unité de monosaccharides d'un polysaccharide, la déduction du nombre d'unités de monosaccharides et du nombre d'hydroxyles libres peut être réalisée comme suit (le calcul est réalisé pour 3 hydroxyles libres) :

Nombre d'unités de glucose : $N_{Glc} = M_{Muc}/M_{Glc}$

Nombre de moles d'hydroxyles libres : $N(OH) = \frac{M(muc)}{3}$

$M_{Muc} = N_{OH} \times 3$ (3 étant le nombre d'hydroxyle libre sur le glucose)

Où la masse molaire du mucilage : $M_{Muc}=1344000$ g/mol et celle du glucose : $M_G=180$ g/mol.

Le nombre d'unités de glucose est de 7467 dans 1 mole de mucilage et le nombre d'hydroxyles libres est de 22400 par mole de mucilage.

La composition du mucilage Muc-030-20 étant de 51 % de polysaccharides neutres et 49 % de polysaccharide acides, les valeurs en nombres d'unités de monosaccharides et le nombre d'hydroxyles libres dans la quantité de mucilage pesée peuvent ainsi être déduites.

Le nombre de moles d'hydroxyles libres estimé dans un échantillon de 150 mg de mucilage est en moyenne 2,5 mmol et dans 200 mg, de 3,3 mmol.

IV.3.2. Etude et mise en œuvre des protocoles de réaction d'estérification du mucilage

Système multiphase Mucilage (solide) /Acides gras (solide)/ADBS (liquide)

La Figure IV-38 montre l'observation au microscope optique du mélange comprenant les acides gras de *I. gabonensis* et le mucilage pris dans un ratio massique 10/1 en présence de 0,12 équivalent molaire de l'ADBS. Les acides gras de *I. gabone*

nsis sont liquéfiés à 50°C puis mélangés avec le mucilage et le mélange est agité au vortex à 500 rpm. L'analyse microscopique révèle une dispersion des filaments correspondant au mucilage dans les acides gras de *I. gabonensis*. Les deux réactifs sont immiscibles et le système est hétérogène. Dans ce système, il apparaît que l'ADBS induit la formation d'objets de types agrégats, cubiques, lamellaires, ou des vésicules qui vont permettre le transfert de matières et la réalisation de la réaction d'estérification interfaciale. Ici, il se pose la question de la technique

appropriée pour l'observation de ces objets et du stade de prélèvement d'échantillons pour le suivi systématique et intégral de la formation de ces objets.



Figure IV-38 : Observation au microscope optique du mélange AGIG/Mucilage en présence d'ADBS (acquisition $\times 10$)

Les réactions d'estérification sont réalisées sur deux sources de mucilage : Muc-030-20, Muc-017-50 et les acides gras de *I. gabonensis* ont été utilisés comme sources lipophiles. Trois méthodes d'agitation ont été testées, l'agitation mécanique (AM), l'ultraturax (ULT) et les ultrasons (US).

Pour la réaction en agitation mécanique, un réacteur batch de 500 mL surmonté d'un tricol équipé d'un agitateur mécanique, d'un dean stark, d'un réfrigérant, et d'une sonde de température est utilisé. Le chauffage se fait par un bain d'huile. L'étude de la réaction d'estérification entre le mélange des acides gras de *I. gabonensis* et le mucilage, est effectuée en présence de l'ADBS utilisé comme catalyseur. L'acide gras et l'ADBS sont pesés dans le réacteur et dissous à 80°C sous agitation mécanique (500 rpm). Le mucilage est ajouté. Le Tableau IV-13 regroupe les essais de synthèse qui ont été réalisés à partir des deux lots de mucilage. Les analyses IRTF et RMN ont été réalisées pour le suivi de la réaction d'estérification.

Tableau IV-13 : Paramètres d'étude pour la mise au point des protocoles de synthèse des esters de mucilage et d'acide gras de *I. gabonensis*

Echantillon	Masse de mucilage (mg)	m _{AGIG} (g)	m _{ADBS} (g)	Mode d'agitation	Température (°C)	Temps (h)
Muc-Es-01	Muc-017-50 223,0	23,0	2,3	30' ULT + AM	100	4
Muc-Es-02	Muc-030-20 151,9	15,1	1,5	ULT	80	6
Muc-Es-03	Muc-030-20 152,9	15,1	1,5	US (5s/20s, 60 %)	80	6

Après réaction, le brut réactionnel est refroidi à température ambiante puis lavé avec de l'éthanol (3×50 mL) avant d'être filtré. Le lavage du mucilage avec l'éthanol permet de précipiter le mucilage. Le mucilage récupéré est sous la forme d'une poudre marron comparé au mucilage natif qui lui est de couleur blanchâtre Figure IV-40. Les mucilages estérifiés (Muc-Es-02, Muc-Es-03) sont analysés en IRTF et en RMN pour l'observation des fréquences des bandes de vibration et des déplacements chimiques caractéristiques des esters formés.

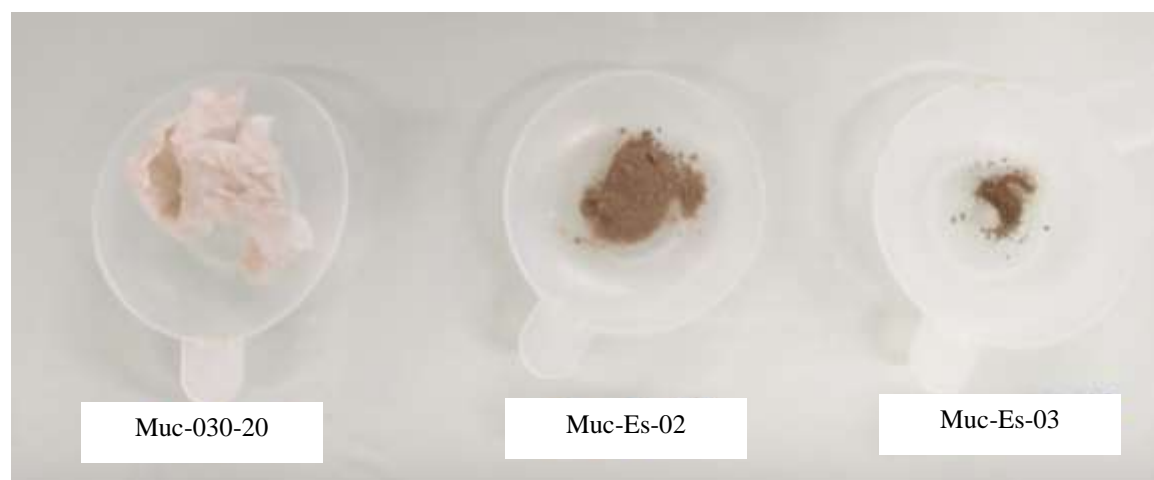


Figure IV-39 : Aspects des Muc-030-20 et produits Muc-Es-02 et Muc-Es-03 obtenus après filtration

IV.4.3. Caractérisation des esters de mucilage

a. Caractérisation par IRTF

La Figure IV-40 présente les mucilages Muc-30-20 et Muc-017-50. La bande entre 3600 et 3000 cm^{-1} représente les vibrations d'élongation des groupes hydroxyles (-OH) caractéristiques des carbohydrates. Entre 3000 et 2800 cm^{-1} , on visualise une bande correspondant aux vibrations d'élongation des groupes C-H et CH_3 . La large bande entre 1700 et 1500 cm^{-1} peut regrouper l'étirement asymétrique de l'ion COO^- mais aussi des liaisons amines et amides des protéines. En effet, les pics caractéristiques des protéines sont observés à 1630 cm^{-1} pour les liaisons C=O des groupes peptidiques et à 1542 cm^{-1} pour les liaisons N-H. Celles-ci participent à la vibration de la bande observée à 1595 cm^{-1} . Les bandes à 1595 cm^{-1} et 1421 cm^{-1} ont été attribuées aux étirements asymétriques de l'ion COO^- des acides uroniques (44,46). En effet, les gommages possèdent des acides uroniques généralement présents sous la forme anionique. En considérant un polysaccharide comme la cellulose, qui ne possède pas de fonction amide ou des ions carboxylates, une bande à 1625 cm^{-1} est observée. Celle-ci correspondrait à l'absorption des liaisons O-H (204). La région entre 1800 cm^{-1} et 1500 cm^{-1} , est généralement utilisé pour détecter la présence des groupes carbonyles. La région entre 1200 cm^{-1} et 800 cm^{-1} est spécifique aux polysaccharides. Cette région est dominée par la superposition des vibrations éthers de l'anneau pyranosique et les vibrations des groupes C-O-H à 1040 cm^{-1} , les liaisons glycosidiques C-O-C 1,4 entre les monosaccharides à 986 cm^{-1} (44,205). La bande à 889 cm^{-1} représente la déformation des liaisons C-H des configurations α et β anomériques des unités de monosaccharides (44,46,206,207).

Ces spectres sont similaires à ceux décrits par Timilsena et *al.* (44) et Hernandez et *al.* (46) pour le mucilage de chia. La différence de composition en polysaccharides acides et neutres ne modifie pas le spectre IR du mucilage. Le Tableau IV-14 regroupe les bandes d'absorption présentes dans le mucilage de chia.

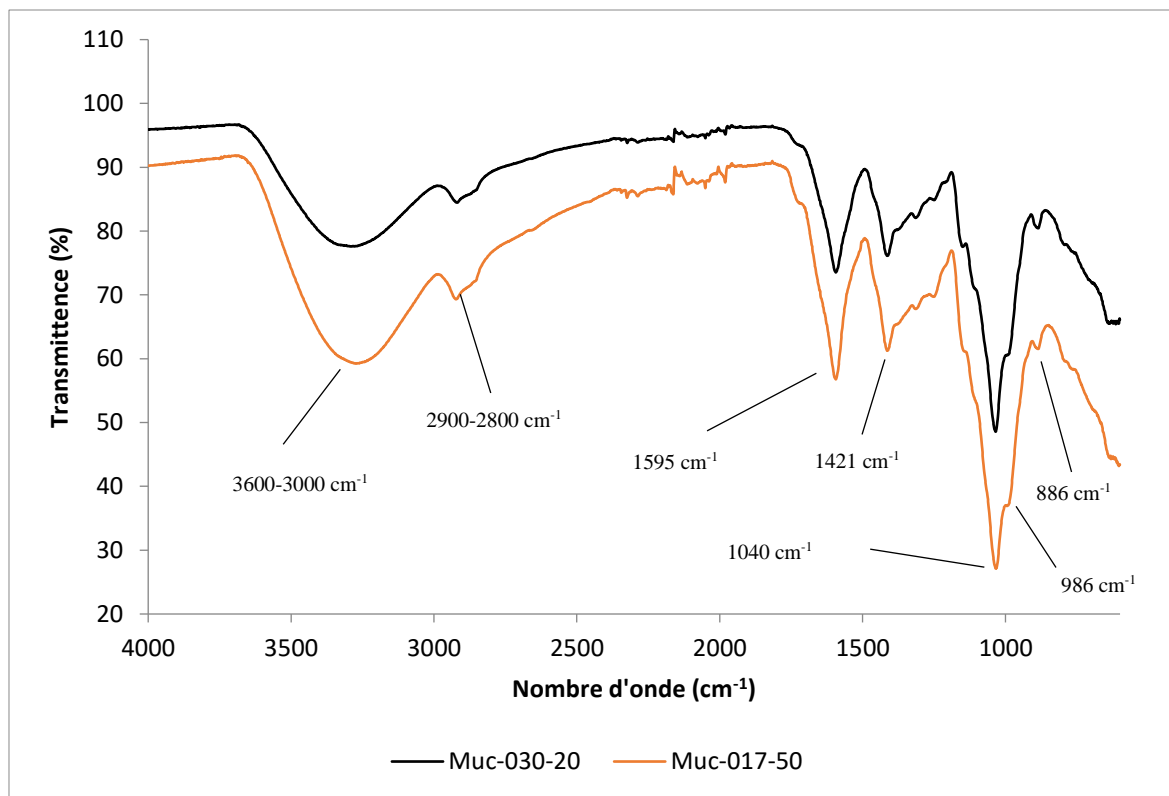


Figure IV-40: Spectre IRTF des mucilages Muc-030-20 et Muc-017-50

Tableau IV-14 : Bandes d'absorption IRTF du mucilage de chia natif

Groupe fonctionnel	Position (cm^{-1})	Intensité	Munoz (46)	Muc-030-20 Muc-017-50
-OH groupes hydroxyle	3600-3000	Forte/Large	3384,8	3700-3000
-C-H vibration	2926	Forte	2924,8	3000-2800
C=O vibration des acides carboxyliques	1725-1700	Forte	1718,8	1726
C=O groupe	1700-1600	Forte	1604,5	1595
-COO ⁻ ion	1550-1400	Moyen	1421,4	1414
C-O groupe ester dans un cycle	1270-1230	Moyennement	1251,7	1219
	1075-1020	faible	1047,2	1033

- **Spectre IRTF du brut réactionnel**

La Figure IV-41 présente le spectre du milieu réactionnel Muc-Es-03 obtenu à partir de Muc-030-20. Le spectre permet d'observer l'apparition de deux bandes de forte intensité à 1740 cm^{-1} et 1728 cm^{-1} en plus de celui des acides gras à 1700 cm^{-1} . Ces bandes sont attribuables aux fréquences $\mu(\text{C}=\text{O})$ des bandes des esters des nouvelles liaisons formées. La Figure IV-42 présente l'agrandissement de la zone entre 1800 et 1600 cm^{-1} .

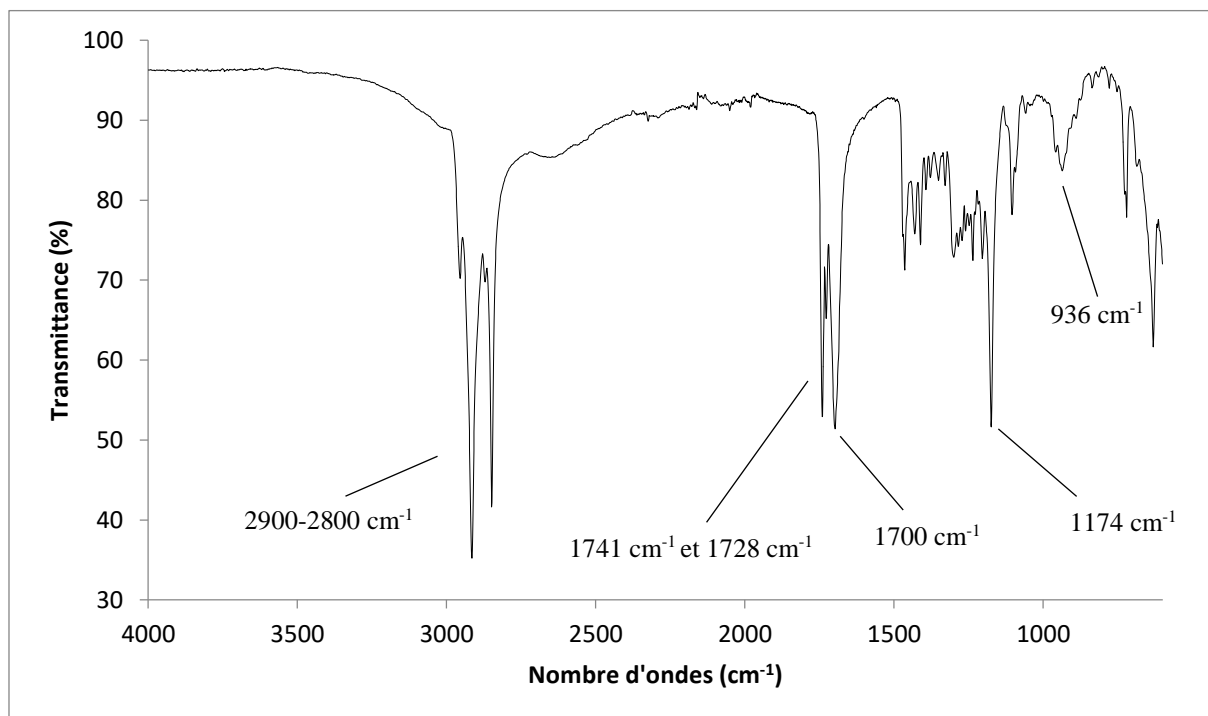


Figure IV-41: Spectre IRTF du brut réactionnel Muc-Es-03

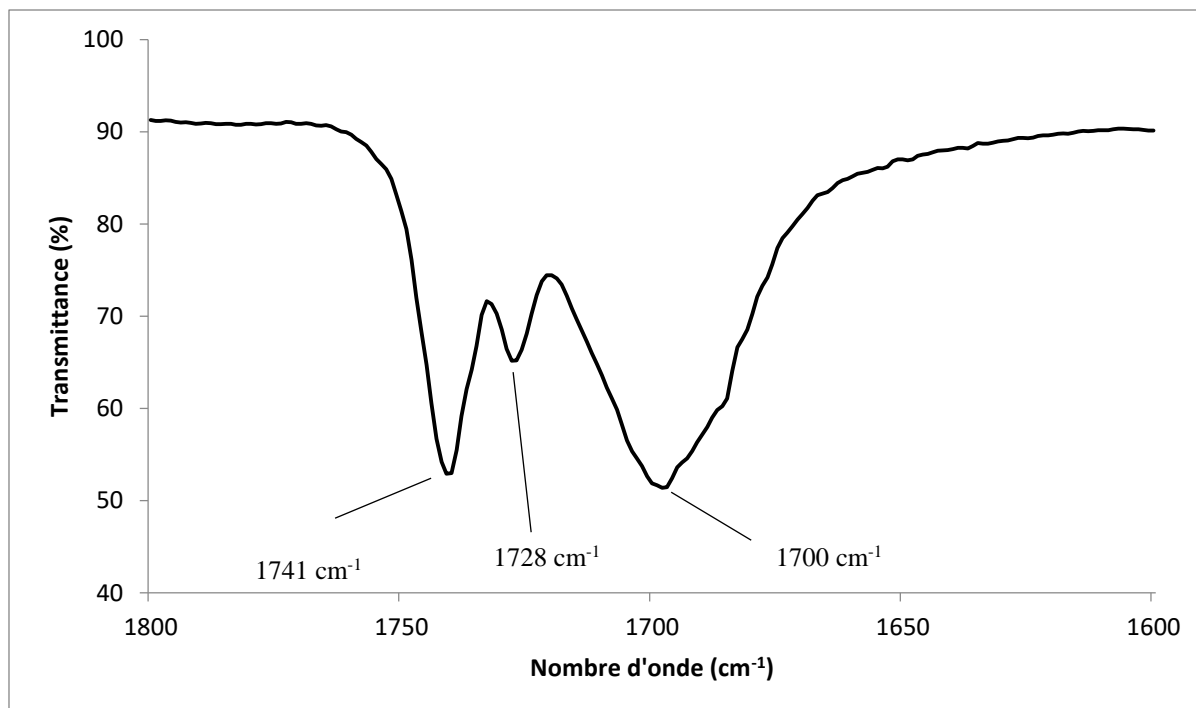


Figure IV-42 : Spectre IRTF du brut réactionnel Muc-Es-03 obtenu à partir de la réaction entre Muc-030-20 et les AGIG sous cavitation ultrasonore

Ces résultats révèlent qu'une modification chimique a été réalisée au cours de la réaction. L'apparition des bandes à 1741 cm^{-1} et 1728 cm^{-1} correspondent à la formation de liaisons esters issues de la réaction entre les acides gras et les hydroxyles des polysaccharides du mucilage. La disparition de la bande à 1595 cm^{-1} correspondrait à la disparition des liaisons O-H. L'étude réalisée par Tristantini et *al.* (208) sur acétylation de la cellulose a permis d'observer en IR l'apparition d'une bande à 1721 cm^{-1} caractéristique du groupe carbonyle formé d'une part et la disparition de la bande à 1624 cm^{-1} correspondant à des vibrations O-H.

Une purification de ce milieu réactionnel est alors réalisée en précipitant le mucilage en suspension dans les acides gras avec de l'éthanol absolu. Le mucilage est récupéré par filtration sous vide.

- **Spectre IRTF des produits**

Les Figure IV-43, Figure IV-44 et Figure IV-45 montrent la superposition des spectres du mucilage natif et celui du mucilage estérifié Muc-Es-01, Muc-Es-02 et Muc-Es-03 après précipitation avec de l'éthanol. Les réactions réalisées sous l'agitation mécanique (Muc-Es-01), par ultraturax (Muc-Es-02) et par cavitation ultrasonore (Muc-Es-03) ont donné des spectres

IRTF très proches. Dans ces différents cas, il y a formation de nouvelles liaisons dans la zone des carbonyles et disparition de la bande à 1595 cm^{-1} . L'apparition de ces bandes observées sur le spectre du milieu réactionnel (sans traitement post réactionnel) permet d'éliminer l'hypothèse d'une réaction avec l'éthanol.

La disparition de la bande à 1595 cm^{-1} n'est pas totale. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées selon la composition du mucilage utilisé et la méthode d'agitation appliquée. Le Tableau IV-15 est un rappel de la composition des mucilages natifs et des produits estérifiés à partir de chacun.

Tableau IV-15 : Composition des mucilages natifs Muc-030-20 et Muc-017-50

Composition	Muc-030-20	Muc-017-50
Protéines (%)	2,8	5,5
Polysaccharides (%)	90	85
- Acides (%)	51	35
- Neutres (%)	49	65

Dans le cas du produit Muc-Es-01 (Figure IV-43) obtenu par agitation mécanique, la bande à 1595 cm^{-1} est de faible intensité.

Le produit Muc-Es-02 (Figure IV-44) obtenu par agitation ultraturrax donne des bandes à 1728 cm^{-1} et 1740 cm^{-1} dont les intensités sont fortes. Rappelons que les valeurs des teneurs en polysaccharides acides et neutres sont respectivement de 51 % et 49 %. Il semble que ces groupes carboxylates des polysaccharides acides puissent interagir avec les groupes hydroxyles libres comme des puits à hydroxyles, non dépliables. Il est possible que la bande à 1666 cm^{-1} corresponde aux ions carboxylates stabilisés avec les groupes hydroxyles. Ce qui expliquerait la perte de la partie carbohydate de ces nouveaux complexes sucres-acides-hydroxyles des chaînes acides uroniques aux cotés des sucres esters formés par la réaction d'estérification. Le produit Muc-Es-03 (Figure IV-45) obtenu par cavitation ultrasonore montre également la diminution de la bande à 1595 cm^{-1} . La bande est cependant moins visible pour les mêmes considérations dues à ces interactions dans les sucres-acides qui fonctionnent comme des puits des sucres-alcools

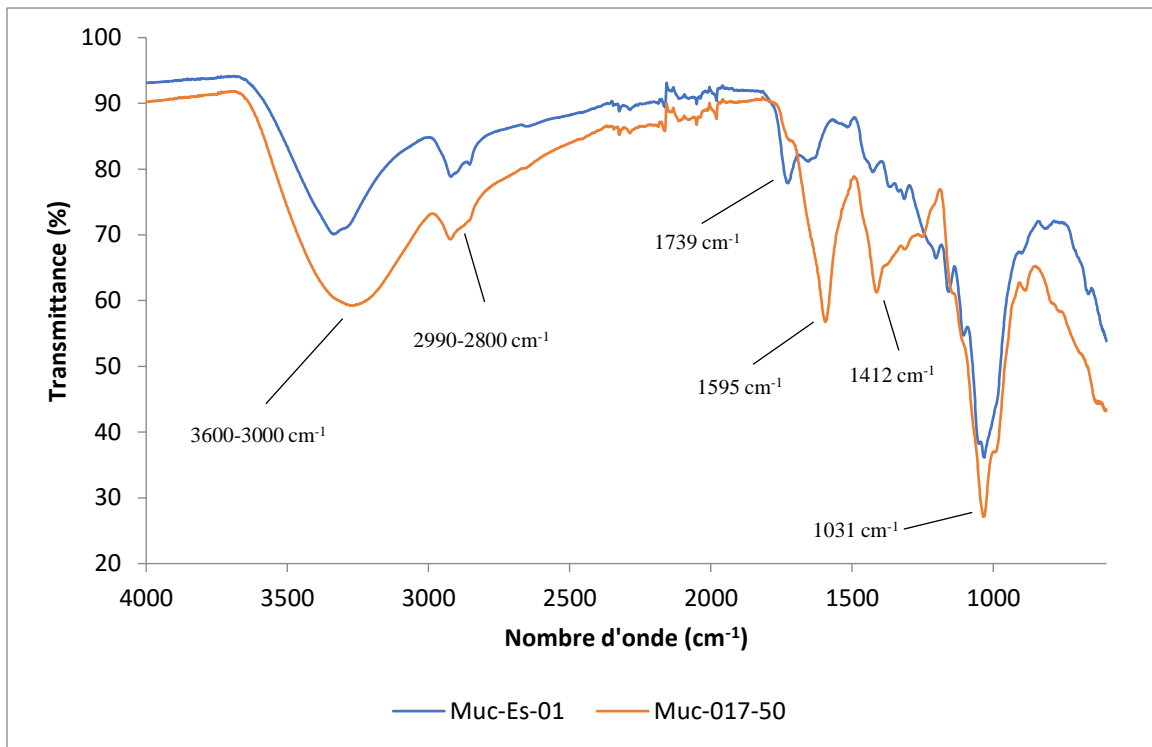


Figure IV-43 : Spectre IRTF du mucilage natif Muc-017-50 et du Muc-Es-01

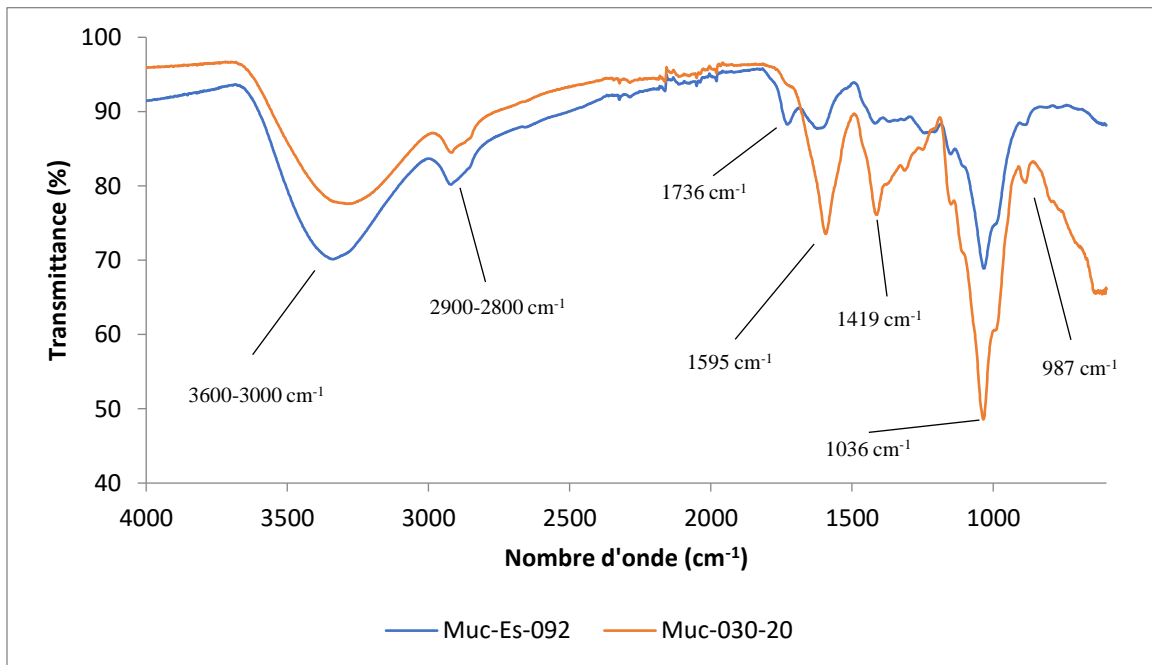


Figure IV-44 : Spectre IRTF du mucilage natif Muc-030-20 et du Muc-Es-02

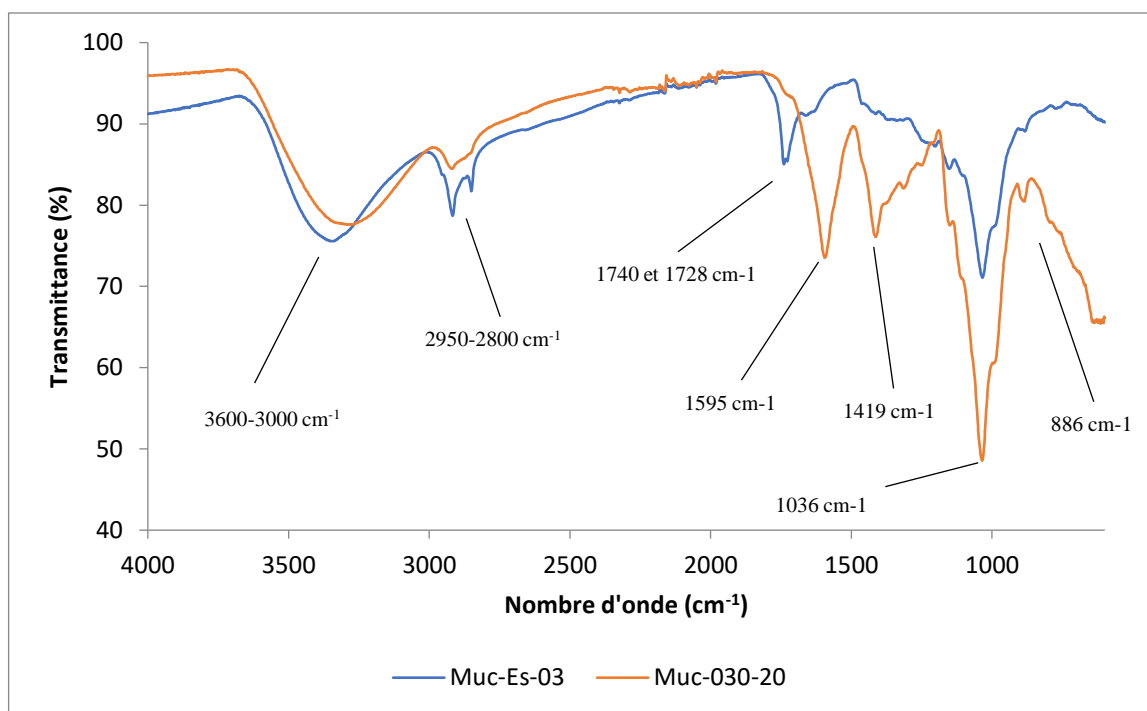


Figure IV-45 : Spectre IRTF du mucilage natif Muc-030-20 et du Muc-Es-03

a. Caractérisation des mucilages modifiés par spectroscopie RMN

• Des mucilages

Les spectres RMN du proton et du carbone du mucilage de chia purifié ont été rapportés par Timilsena et *al.* (44). La purification consistait à éliminer des composés insolubles tels que la cellulose, l'hémicellulose et la lignine ainsi que les protéines. Dans notre étude, le mucilage n'a pas subi de traitement de purification avant d'être modifié.

Les études antérieures (44,51,209,210) permettent de décrire 3 zones pour les déplacements chimiques des protons pour le mucilage de graines de chia :

- de 6 à 4,3 ppm, les protons anomériques, plus précisément α anomérique (4,8-4,3ppm) et β anomérique (5,5-4,9)
- de 4,3 à 3 ppm les protons non anomériques de H2 à H6.
- Entre 1,98 et 1 ppm, on identifie les groupes des protons de COOCH_3 (1,82 ppm) et de C-CH_3 (1,21 et 1,15 ppm)
- des pics entre 0,8 ppm et 5,3 ppm ont été détectés (Figure IV-46).

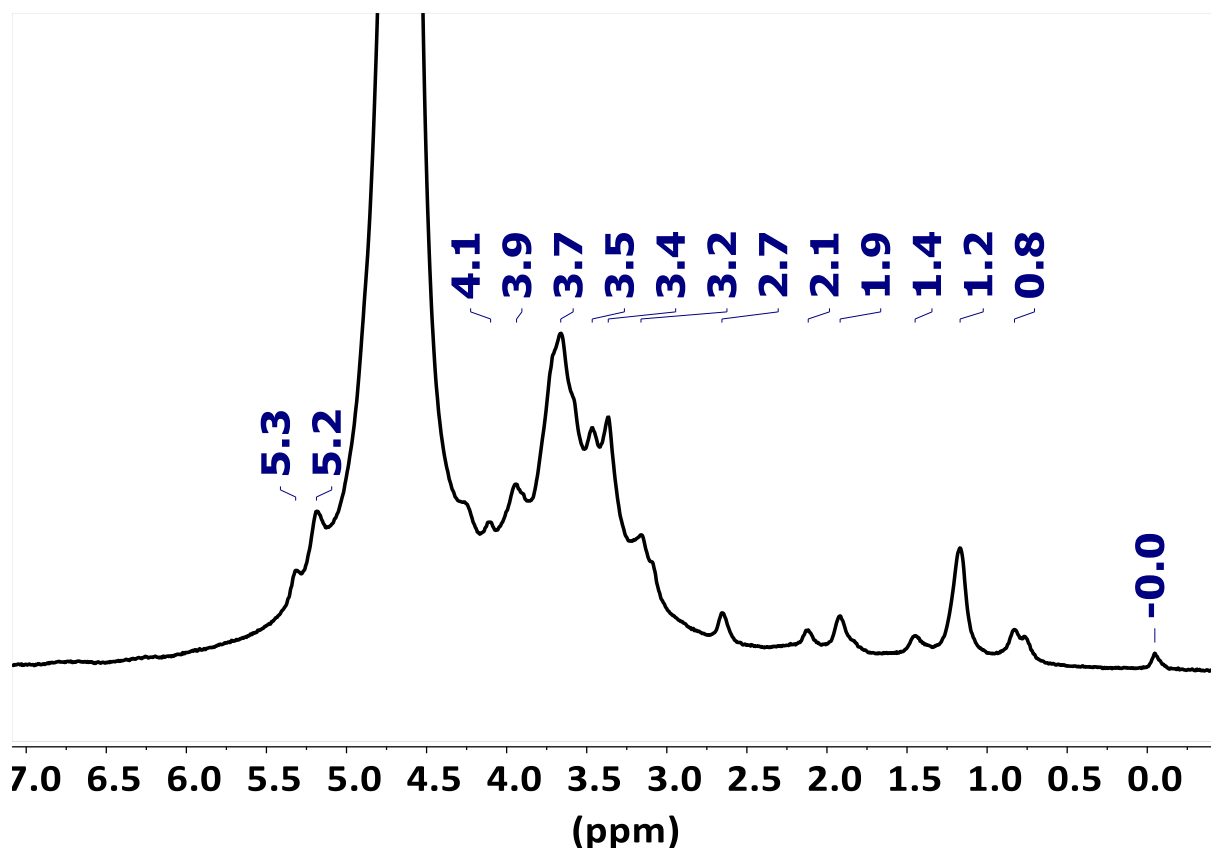


Figure IV-46 : Spectre ¹H RMN du mucilage de chia Muc-017-50

Pour la ¹³C RMN l'analyse réalisée par Timilsena *et al.* (44) a permis de détecter 26 pics au total. Ces derniers correspondent à trois unités de résidus des monosaccharides comme suit :

- 6 carbones de C-1 à C-6 du résidu 1,4- α -D-glucosyl correspondant aux déplacements chimiques 102,5 ppm, 77,9 ppm, 74, 5 ppm, 73,0 ppm, 72,2 ppm et 60,0 ppm attribués à la répétition du résidu.
- 5 carbones de C1 à C5 de l'unité 1-4- β -D-xylopyranosyl correspondant aux signaux 101,9 ppm, 77,5 ppm, 73,2 ppm 71,9 ppm et 66,3 ppm.
- 6 carbones C1 à C6 du résidu 4-O-méthyl acide glucuronique attribués aux signaux 177,3 ppm, 98,6 ppm, 82,9 ppm, 73,6 ppm, 72,2 ppm et 71,9 ppm.
- à 17,6 et 14,9 ppm on pourrait attribuer à des éthers, esters et acétals cycliques.

- le pic à 176,9 ppm révèle la présence des acides galacturoniques dans le mucilage de chia.

Ainsi, en se basant sur ces données collectées, les déplacements chimiques propres à chaque résidu ont été observés. Les spectres carbones des mucilages Muc-30-20 (Figure IV-47) et muc-017-50 (Figure IV-48) présentent les mêmes signaux. Le résidu 1,4- α -D-glucosyl peut être signalé par les pics à 101,4 ppm et 60-62ppm. Le résidu acide 4-O-méthyl glucuronique peut être signalé par les déplacements chimiques à 101,2 et 69,3 ppm. Le pic à 76,2 ppm comprend les C3 de ces deux résidus. Les pics à 176,4 et 97,4 ppm et correspondent aux carbones du résidu 4-O-méthyl- acide glucuronique.

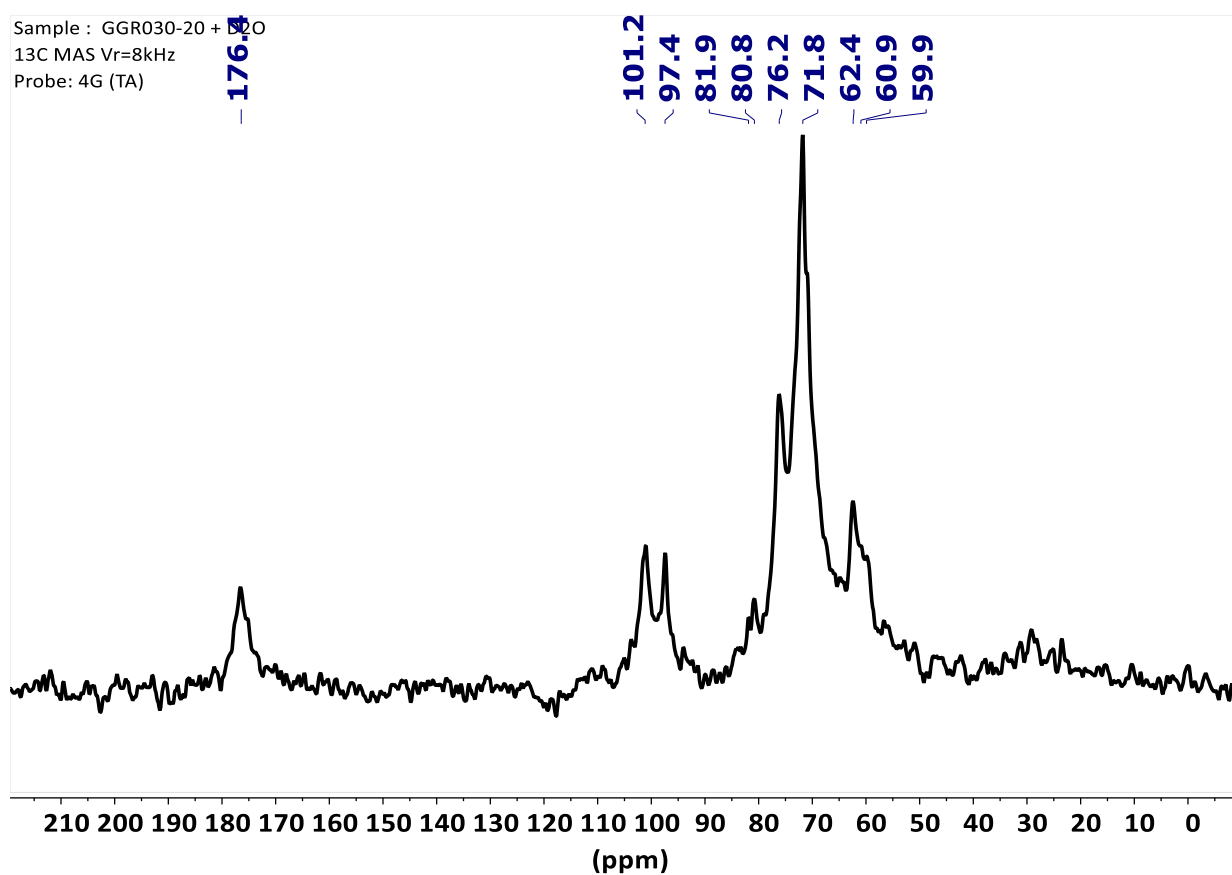


Figure IV-47 : Spectre ¹³C RMN du mucilage Muc-030-20

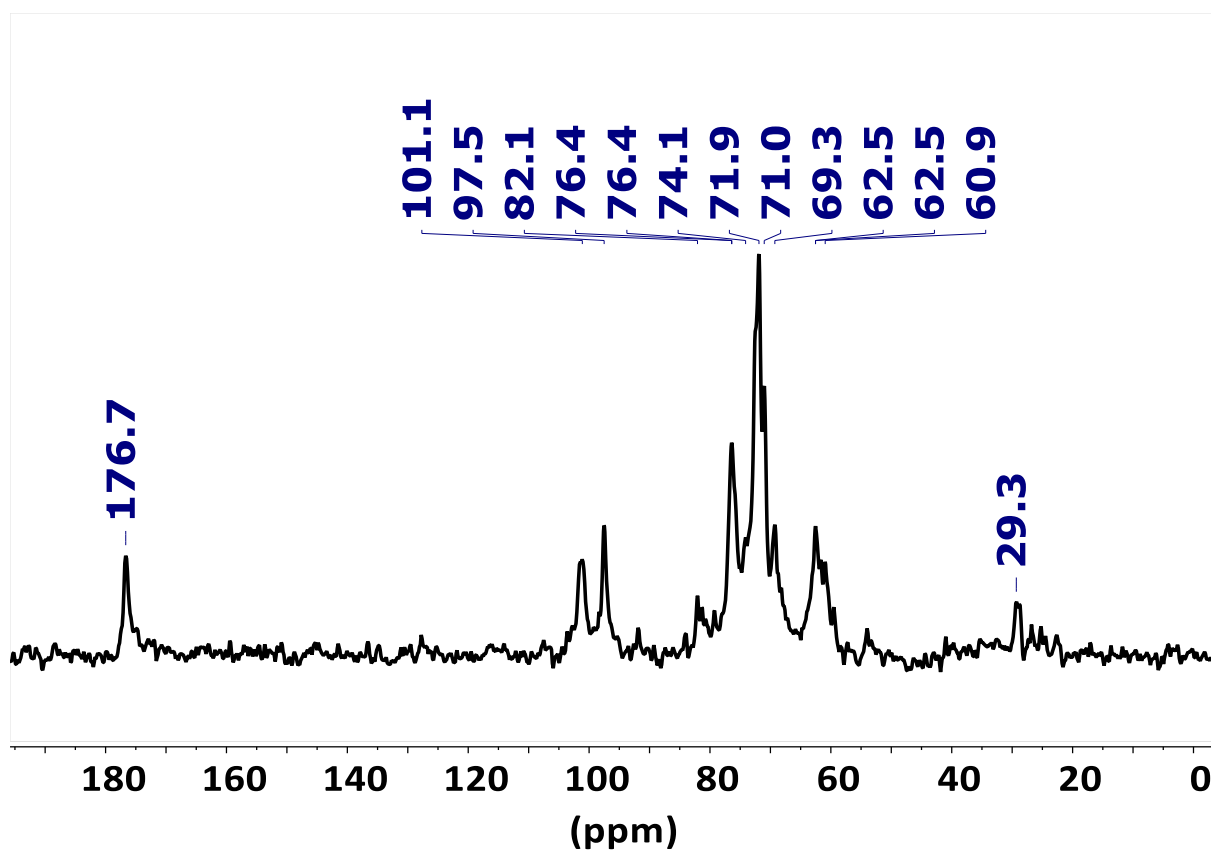


Figure IV-48 : Spectre ¹³C RMN du mucilage Muc-017-50

- **Spectre ¹H RMN du mucilage estérifié Muc-030-20**

Le spectre des déplacements chimiques des protons du mucilage natif, des produits Muc-Es-02 (obtenu par agitation ultraturrax) et Muc-Es-03 (obtenu par cavitation ultrasonore) sont présentés sur la Figure IV-49.

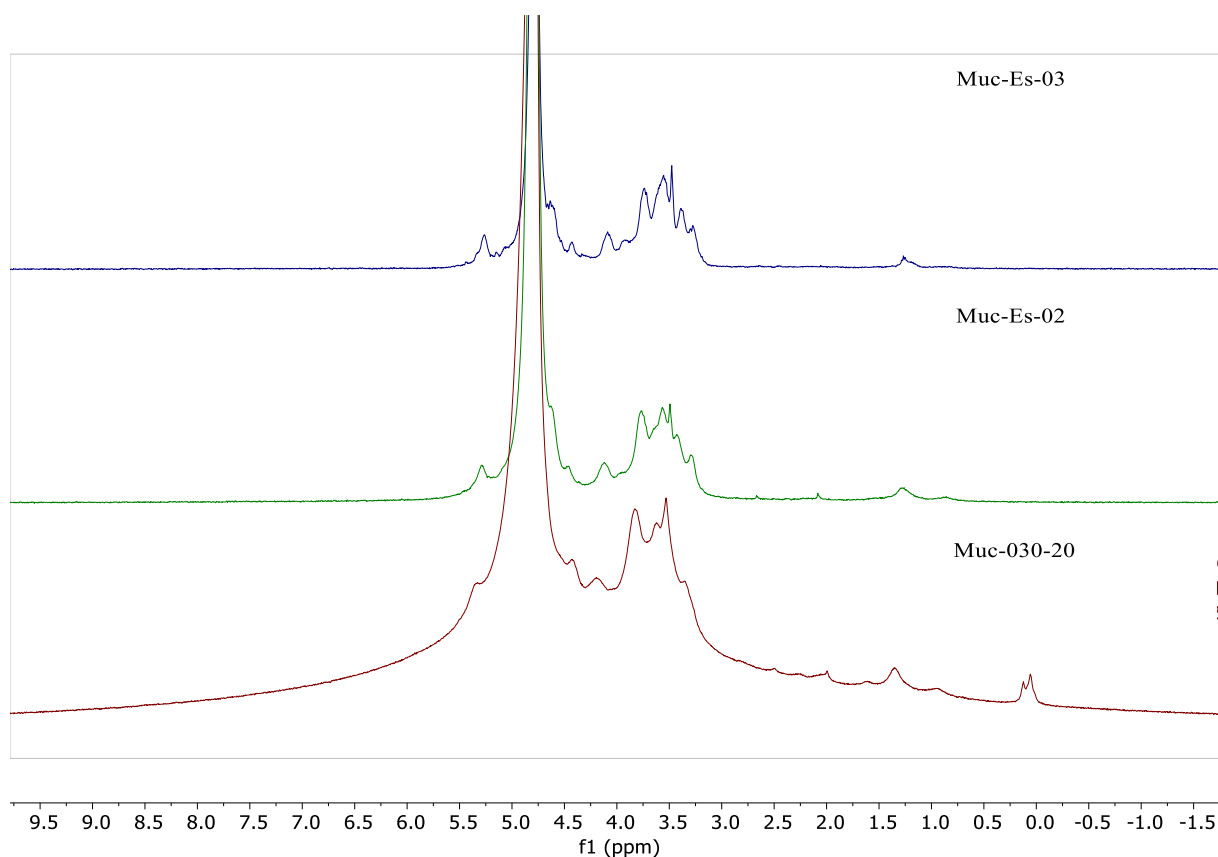


Figure IV-49 : Spectre 1H RMN du Muc-030-20, Muc-Es02 et Muc-Es-03

Les spectres de déplacements chimiques des carbones des mucilages estérifiés Muc-Es02 (Figure IV-50) et Muc-Es-03 (Figure IV-51) ont révélé moins de pics que ceux détectés par Timilsena *et al.* (44). Les pics caractéristiques du résidu 1,4- α -D-glucosyl à 102 ppm et 62 ppm observés. A 174,4 ppm et 173,0 ppm, les pics correspondraient aux carbones des fonctions esters formées au cours de la réaction. Les pics à 176 ppm présents dans le mucilage ne sont pas visibles dans les produits. A 29,1-31,6 ppm et 13,5 ppm les pics pourraient correspondre respectivement aux CH₂ et les CH₃ de la chaîne grasse.

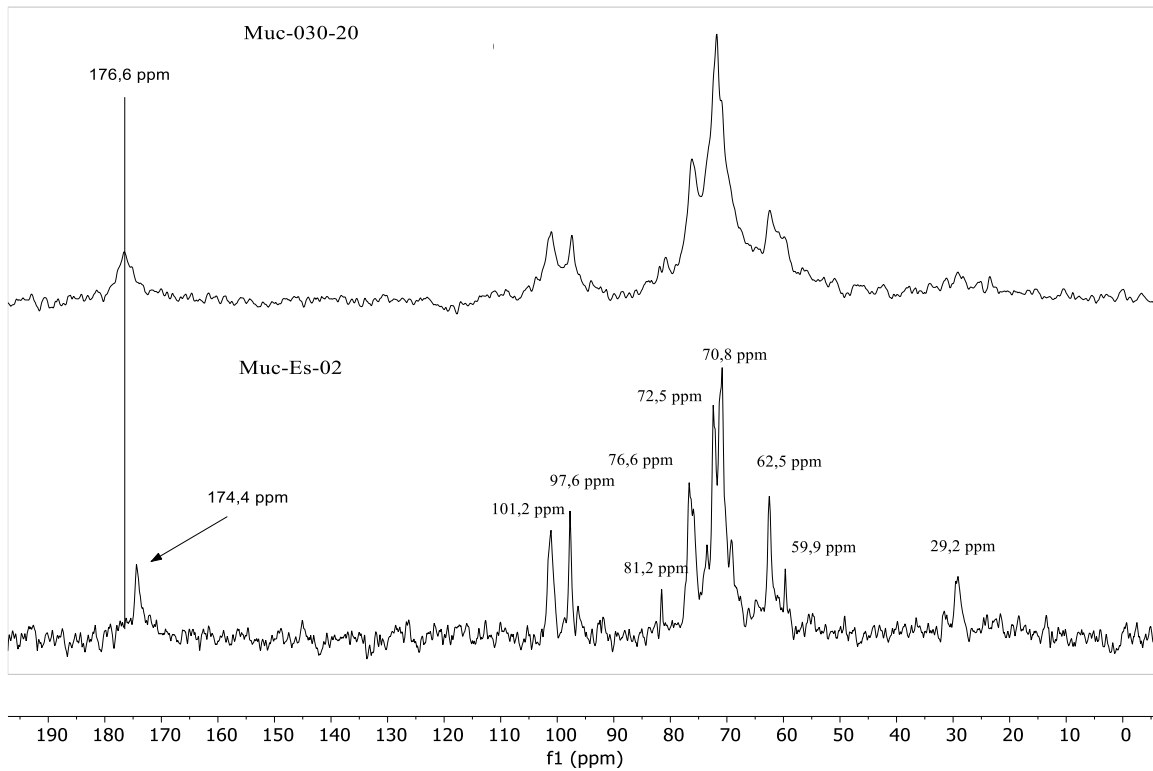


Figure IV-50: Spectre ^{13}C RMN du mucilage acylé Muc-Es-02

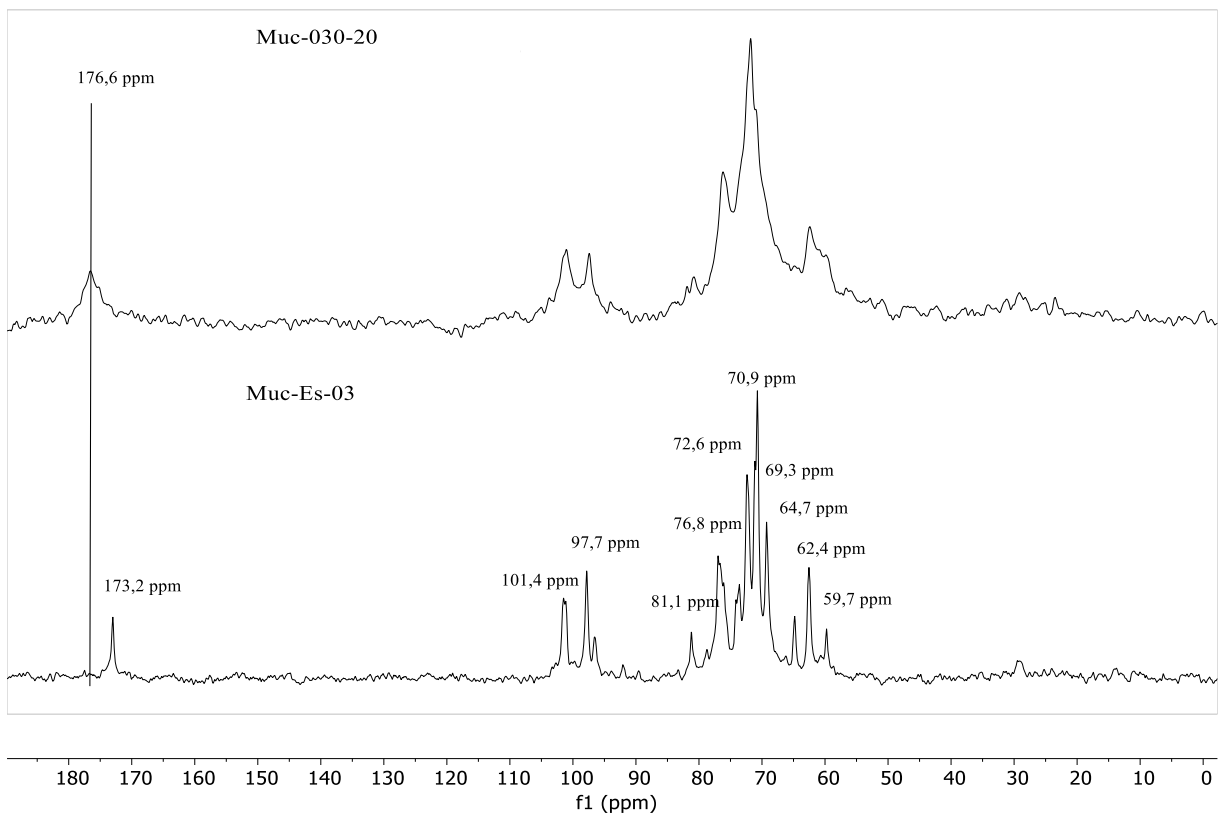


Figure IV-51 : Spectre ^{13}C RMN du mucilage acylé Muc-Es-03

Que ce soit par analyse par ^1H RMN ou par ^{13}C RMN, la mise en évidence des protons et carbones caractéristiques formés par des groupes esters sont visualisés. Les preuves de la réaction d'estérification entre le mucilage et les acides carboxyliques sont rassemblés. Le mode d'agitation crée des interactions fortes entre les groupes carboxyliques et les hydroxyles libres et les groupes carboxyesters formés.

b. Viscosité intrinsèque des mucilages estérifiés

La viscosité intrinsèque est une grandeur qui dépend de la conformation des molécules mais aussi de la rigidité des chaînes de ces polymères. Elle est liée à la masse molaire du polymère. La Figure IV-52 présente les courbes obtenues à partir de la viscosité cinématique des échantillons pour des concentrations qui varient de 0,01 % à 0,1 %. Les valeurs de viscosité intrinsèques selon Kraemer et Huggins sont extrapolées de ces courbes. La valeur obtenue pour la méthode de Solomon est celle calculée pour la concentration la plus faible.

La solubilisation de Muc-Es-02 n'est pas totale, on retrouve des filaments de mucilage dans de l'eau. Cela peut suggérer un greffage des chaînes grasses sur le mucilage et donc une solubilité diminuée. La mesure de la viscosité sur ce mélange révèle un changement de viscosité de l'échantillon estérifié Muc-Es-02 comparé au mucilage natif. Selon les différentes méthodes de détermination, on remarque que la viscosité intrinsèque diminue de façon considérable de 36,18 dL/g à 6,34 dL/g (Tableau IV-16). Cela révèle un changement important dans la nature du polymère à la fin de la réaction. Il s'agirait de l'apport lipophile remarquable des chaînes grasses apportées par les acides gras. La preuve est faite de la lipophilisation du mucilage de chia à la suite de la réaction d'estérification entre le mucilage et le mélange d'acides gras laurique et myristique de *I. gabonensis*. Le caractère hydrophile du mucilage estérifié est beaucoup réduit par la réduction des liaisons hydrogènes sur le mucilage modifié. Nous préparons ainsi un nouveau biopolymère mucilaginé doublement acylé par les groupes acyles laurique et myristique.

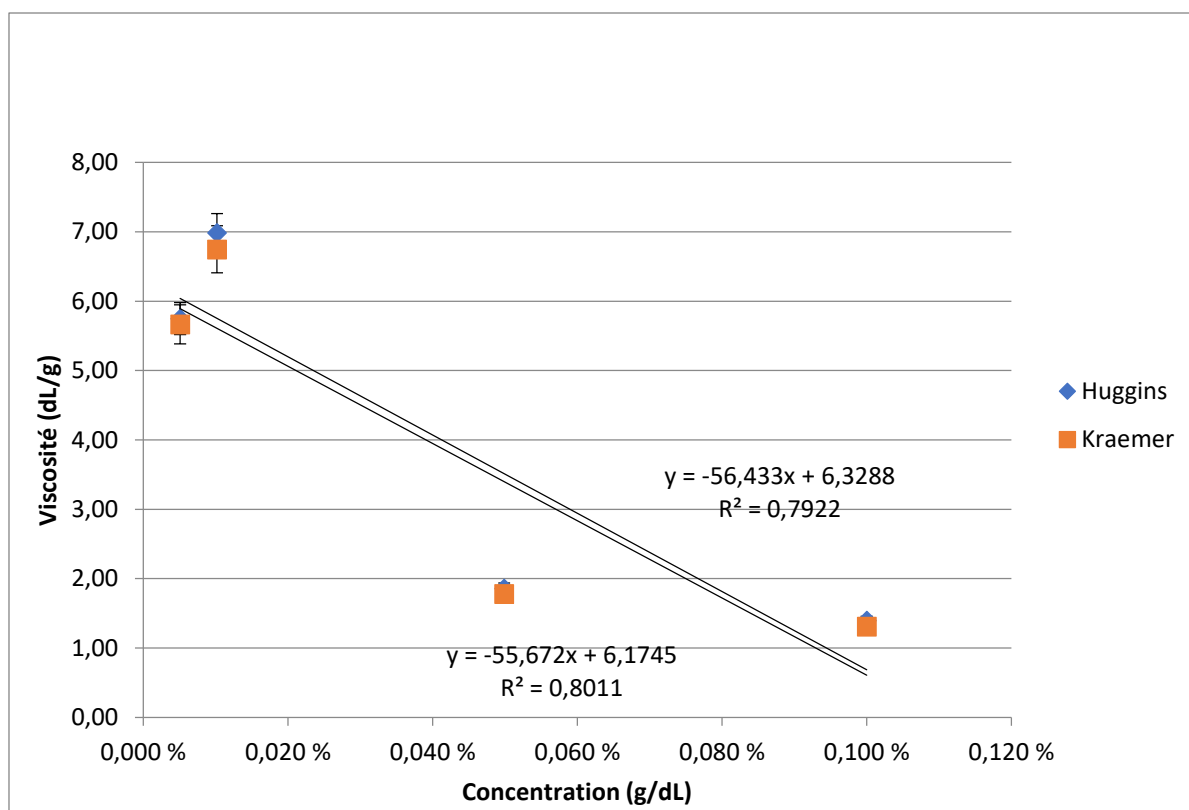


Figure IV-52 : Représentation de Kraemer et Huggins pour la détermination de la viscosité intrinsèque

Tableau IV-16 : Viscosité intrinsèque du mucilage et du mucilage acylé

	Kraemer	Huggins	Solomon	Viscosité intrinsèque (dL/g)
Muc-030-20	32,37	41,43	34,75	36,18±4,70
Muc-ES-02	6,75	6,57	5,69	6,34±0,43
Mus-Es-03				

Conclusion

L'acylation des polysaccharides présente plusieurs défis à relever. Les réactifs mis en jeu sont immiscibles et hétérogènes. Pour faciliter leur mise en contact, l'utilisation des milieux organisés, est nécessaire. Concernant le mucilage, il a été montré qu'il se disperse dans le mélange d'acides de *I. gabonensis* en présence de l'ADBS. L'ADBS permet de catalyser la réaction d'estérification interfaciale. L'efficacité catalytique se traduit par un double greffage

des acides C12:0 et C14:0 du mélange de beurre de *I. gabonensis*. Des modifications structurales ont été observées par spectroscopie IR et RMN. L'apparition des pics caractéristiques des carbonyles en IR révèlent qu'une réaction se produit entre le mucilage et les acides gras de *I. gabonensis*. L'ADBS favorise la mise en contact des réactifs et la réaction d'estérification de ce substrat hydrophile complexe. La voie de la catalyse en présence de l'ADBS est très prometteuse pour la synthèse des esters de sucre notamment celle des esters de mucilage. D'un point de vue économique, le coût généralement peu élevé de cet agent à double facette permet de prévoir son utilisation dans des procédés efficaces et éco-compatibles à plus grande échelle.

Conclusion générale

Les graines de chia et les amandes de *I. gabonensis* sont des agroressources dont les compositions respectives présentent des atouts valorisables en alimentation, nutrition et en industrie. Le mucilage des graines de chia, riche en polysaccharides a été pris comme source hydrophile pour la synthèse des esters de polysaccharides. L'extraction de ce mucilage a été réalisée en milieu aqueux par cavitation ultrasonore. La viscosité, suivie au cours de l'extraction du mucilage, augmente assez rapidement dans le milieu. Sur un temps prolongé, l'effet cisailant des ultrasons sur le mucilage extrait entraîne une diminution de la viscosité. Le rendement de synthèse et la composition du mucilage (cendre, protéines, polysaccharides neutres et acides, masse molaire) sont liés à la durée de traitement ultrasonore au cours de l'extraction. Le rendement d'extraction augmente avec la durée de traitement ultrasonore. Les cendres sont majoritairement extraites en début de traitement tandis que le taux de protéines augmente avec la durée d'extraction. Pour les traitements de courte durée, la teneur en polysaccharides acides et neutres était respectivement de 51 % et 49%. A 50 min, les polysaccharides acides étaient de 35 % et les neutres à 65 %. La masse molaire des polysaccharides s'élevait à 1344 kDa. L'analyse thermogravimétrique a révélé la stabilité du mucilage à des températures élevées. La connaissance des propriétés physico-chimiques de polysaccharides du mucilage justifie son utilisation dans des applications industrielles.

La source lipophile, l'amande de *I. gabonensis* a montré une corrélation entre sa structure et la composition lipidique. En effet l'amande fournit 63 % en beurre hautement saturé. Le pressage de l'amande a permis d'extraire 48 % de beurre par rapport à la masse de la graine. Cette valeur est supérieure au rendement de pressage obtenu par les études antérieures. Avec 51 % d'acide myristique et 38 % d'acide laurique, l'espèce *I. gabonensis* fournit des beurres myristique-laurique. Cette espèce est une source offrant un beurre qui peut participer à augmenter le marché mondial de ces acides gras C:14 et C:12. Les propriétés thermiques du beurre ont montré que la température de fusion est de 43°C et la température de décomposition est 415°C. Les propriétés physico-chimiques du beurre montrent que celui-ci pourrait être utilisé en l'état en agro-alimentaire et dans des formulations cosmétiques et pharmaceutiques.

L'objectif de la thèse était de synthétiser des esters de sucre d'acides gras à partir de ces bioressources. L'immiscibilité et l'hétérogénéité des réactifs d'une part et l'élimination du co-produit au cours de ces réactions réversibles d'autre part sont apparus comme des paramètres déterminants qu'il a été nécessaire de maîtriser pour réaliser et optimiser l'obtention des esters

de sucre. Pour parvenir à la synthèse, d'ester de mucilage, une démarche partant du glucose comme modèle et des acides gras et des esters méthyliques a été mise en place afin de vérifier la faisabilité de la réaction.

Concernant la synthèse des esters de glucose, deux voies de synthèse ont été explorées. La première a été la voie de synthèse d'esters de glucose en milieu eutectique profond par catalyse basique. L'approche mise en œuvre a permis de créer le DES glucose/choline d'une part et l'adsorption de l'ester méthylique de C12:0 sur le carbonate de potassium. Ensuite il a été aisé de mélanger ces deux systèmes dans un réacteur batch fortement agité porté à pression réduite et à température modérée. Dans cette réaction de transestérification entre le glucose et le laurate de méthyle en présence de carbonate de potassium, le glucose a joué les rôles simultanés de réactif et de co-constituant du DES abaisseur de point de fusion de l'ensemble glucose/choline. Les analyses RMN des constituants des milieux réactionnels ont révélé la formation de laurate de glucose mais aussi de sous-produits dû au non-traitement des réactifs en amont de la réaction. Cette voie de synthèse des esters de sucre mérite de réaliser des travaux supplémentaires pour l'amélioration de la réaction. Il s'agirait de sécher tous les réactifs avant la réaction afin d'éviter des réactions non désirées sur le sucre. Il serait intéressant de poursuivre ces travaux en réalisant la purification du brut réactionnel et de caractériser de façon efficace les produits obtenus. Une étude sur l'utilisation des bruts réactionnels pourrait être réalisée afin d'envisager leur utilisation sans purification.

La deuxième voie explorée de synthèse des esters de glucose a été étudiée en milieu organisé provoquée par la synergie entre l'ADBS avec les acides gras. Le choix de l'ADBS a été motivé par les études antérieures mettant en œuvre sont son double rôle de catalyseur et de tensioactif notamment dans les réactions réversibles (réactions d'estérification, transestérification, éthérification...) confrontées à l'immiscibilité des réactifs et à la co-production des molécules d'eau. L'ADBS permet la mise en contact des réactifs immiscibles grâce à un système d'organisation du milieu par sa nature en tant qu'agent émulsifiant. Son double rôle de catalyseur et de tensioactif ainsi que son rôle de compatibilisant des réactifs hétérogènes permet leur évolution vers des systèmes pseudo-homogènes bien appropriés pour le déroulement des réactions d'estérifications dans des conditions de pression et température contrôlables. Les rendements de synthèse des esters de glucose ont été déterminés par RMN sur les bruts réactionnels. Les résultats obtenus ont montré que les rendements de synthèse sont dépendants du rapport molaire sucre/acide gras, de la quantité de catalyseur et de la méthode d'agitation. Des rendements de l'ordre de 47% d'esters de glucose ont été obtenus pour un ratio molaire 2/1

et une quantité de 0,12 équivalent de l'ADBS. La longueur de la chaîne en C12:0 et C14:0 des acides gras laurique et myristique n'a pas révélé une différence significative dans le rendement de synthèse des esters de glucose. La réaction d'estérification entre le glucose et les acides gras du beurre de *I. gabonensis* en présence de l'ADBS a donné un rendement de 45%. La caractérisation des produits par spectrométrie de masse et par RMN a permis de mettre en évidence la composition en monoesters et diesters dans le milieu. Les propriétés tensioactives et les indices de stabilité des émulsions des esters de glucose obtenus avec les acides laurique, myristique et acides gras de *I. gabonensis* ont été comparés à celles d'un émulsifiant commercial d'ester de sucre pris comme référence. Les valeurs obtenues pour les laurate de glucose, myristate de glucose et esters de *I. gabonensis* sont proches de l'émulsifiant commercial.

La réaction entre le mélange d'acides C12:0 et C14:0 du beurre de *I. gabonensis* et le mucilage de chia en présence de l'ADBS a permis une modification structurale du biopolymère conduisant à la formation d'ester. La viscosité intrinsèque du produit obtenu révèle un changement de propriétés du polysaccharide acylé. Grâce à la composition intrinsèque du mélange d'acides gras du beurre de *I. gabonensis*, il s'opère la double acylation du mucilage qui renforce son caractère lipophile.

Dans ce travail, plusieurs voies d'obtention des esters de sucre ont été explorées. Des études sur les modes d'actions et caractérisation des milieux au cours de la réaction méritent d'être approfondies. Chaque cas d'acides gras solides doit faire l'objet d'une étude systématique de recherche de ces objets organisés lorsque le glucose ou le mucilage est mis en présence de l'ADBS pour réaliser la réaction d'estérification. Les propriétés rhéologiques ainsi que les propriétés tensioactives, moussantes et émulsionnantes devraient être réalisées afin d'élargir l'utilisation de ces nouveaux monoesters, diesters ou des monoesters mixtes de monosaccharides et de polysaccharides de degré de substitution=1-2. Ces voies ouvrent une palette assez large de possibilités de mise en œuvre des sucres avec des acides gras. Le microscope optique serait-il approprié pour l'observation de ces systèmes organisés mettant en jeu des réactifs hétérogènes ? Que donneraient les acides gras à moyennes chaînes en C18 à longue chaîne en C20 - C22 et en chaînes supérieures en terme de réactivité dans ces milieux organisés et de qualité d'esters de sucre et de DS ? Etant donné les gisements représentés par les beurres de *I. gabonensis* issus des variétés et espèces diverses riches en beurre haut laurique et haut myristique, il serait intéressant de les utiliser en l'état de triglycérides avec les

monosaccharides ou polysaccharides pour les transformer par interestérisation en sucroesters originaux de DS faible dans ces milieux organisés.

Bibliographie

1. Silvestre F, Aubry J-M, Benvegna T, Brendle J, Durand M, Lavergne A, et al. Agro-resources for a sustainable chemistry. *Actualité Chimique*. 2010;(338–339):28–40. http://www.lactualitechimique.org/spip.php?numero_article1474.
2. Nyame Mendendy Boussambe G, Valentin R, Fabre J-F, Navailles L, Nallet F, Gaillard C, et al. Self-Assembling Behavior of Glycerol Monoundecenoate in Water. *Langmuir*. 2017;33(13):3223–3233. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03584>.
3. Valentin R, Alignan M, Giacinti G, Renaud FNR, Raymond B, Mouloungui Z. Pure short-chain glycerol fatty acid esters and glycerylic cyclocarbonic fatty acid esters as surface active and antimicrobial coagels protecting surfaces by promoting superhydrophilicity. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012;365(1):280–288. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.09.010>.
4. Foley P, Pour AK, S. Beach E, B. Zimmerman J. Derivation and synthesis of renewable surfactants. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(4):1499–1518. <https://doi.org/10.1039/C1CS15217C>
5. Bikanga R. Propriétés tensioactives de dérivés 3-0-acyle, 3-0-alkyle et 3-desoxy-3-s-alkyle du d-glucose [thesis]. [Amiens]: Université de Picardie Jules Verne; 1993. <http://www.theses.fr/1993AMIES003>.
6. Fabre J-F, Lacroux E, Valentin R, Mouloungui Z. Ultrasonication as a highly efficient method of flaxseed mucilage extraction. *Industrial Crops and Products*. 2015;65:354–360. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.015>.
7. Gravé G, Mouloungui Z, Poujard F, Cerny M, Pauthe C, Koumba IS, et al. Accumulation during fruit development of components of interest in seed of Chia (*Salvia hispanica* L.) cultivar Oruro© released in France. *Oilseeds & fats Crops and Lipids*. 2019;26(50). <https://doi.org/10.1051/ocl/2019037>.
8. Ixtaina VY, Nolasco SM, Tomás MC. Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Industrial Crops and Products*. 2008;28(3):286–293. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.009>.

9. Cahill JP. Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (*Lamiaceae*). *Economic Botany*. 2003;57(4):604–618. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2003\)057\[0604:EOCSHL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2003)057[0604:EOCSHL]2.0.CO;2).
10. Bochicchio R, Philips TD, Lovelli S, Labella R, Galgano F, Di Marisco A, et al. Innovative Crop Productions for Healthy Food: The Case of Chia (*Salvia hispanica* L.). In: Vastola A, editor. *The Sustainability of Agro-Food and Natural Resource Systems in the Mediterranean Basin*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 29–45. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16357-4_3
11. Segura-Campos MR, Ciau-Solís N, Rosado-Rubio G, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. Physicochemical characterization of chia (*Salvia hispanica*) seed oil from Yucatán, México. *Agricultural Sciences*. 2014;5(3):220–226. <http://dx.doi.org/10.4236/as.2014.53025>.
12. Coelho MS, Salas-Mellado M de las M. Chemical Characterization of Chia (*Salvia hispanica* L.) for Use in Food Products. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2014;2(5):263–269. <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-5-9>.
13. Capitani MI, Ixtaina VY, Nolasco SM, Tomás MC. Microstructure, chemical composition and mucilage exudation of chia (*Salvia hispanica* L.) nutlets from Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(15):3856–3862. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6327>.
14. Da Silva BP, Anunciação PC, Matyelka JC da S, Della Lucia CM, Martino HSD, Pinheiro-Sant’Ana HM. Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. *Food Chemistry*. 2017;221:1709–1716. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.115>.
15. Ayerza R, Coates W. Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition research*. 2005;25(11):995–1003. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2005.09.013>.
16. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*. 2009;7(1):65–74. <https://doi.org/10.2174/157015909787602823>.

17. Salazar-Vega IM, Segura-Campos MR, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. Antihypertensive and Antioxidant Effects of Functional Foods Containing Chia (*Salvia hispanica*) Protein Hydrolysates. In: Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry. Valdez, B. InTech; 2012.
18. Segura Campos MR, Peralta González F, Chel Guerrero L, Betancur Ancona D. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides of Chia (*Salvia hispanica*) Produced by Enzymatic Hydrolysis. International Journal of Food Science. 2013;2013:1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/158482>.
19. Olivos-Lugo BL, Valdivia-López MÁ, Tecante A. Thermal and Physicochemical Properties and Nutritional Value of the Protein Fraction of Mexican Chia Seed (*Salvia hispanica* L.). Food Science and Technology International. 2010;16(1):89–96. <https://doi.org/10.1177/1082013209353087>.
20. Sandoval-Oliveros MR, Paredes-López O. Isolation and Characterization of Proteins from Chia Seeds (*Salvia hispanica* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2013;61(1):193–201. <https://doi.org/10.1021/jf3034978>.
21. Orona-Tamayo D, Valverde ME, Nieto-Rendón B, Paredes-López O. Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. LWT - Food Science and Technology. 2015;64(1):236–242. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.033>.
22. Muñoz LA, Aguilera JM, Rodríguez-Turiénzo L, Cobos A, Díaz O. Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate. Journal of Food Engineering. 2012;111(3):511–518. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.031>.
23. Muñoz LA, Cobos A, Díaz O, Aguilera JM. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. Journal of Food Engineering. 2012;108(1):216–224. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.037>.
24. Redgwell RJ, Fischer M. Dietary fiber as a versatile food component: an industrial perspective. Molecular Nutrition & Food Research. 2005;49(6):521–535. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500028>.

25. Borneo R, Aguirre A, León AE. Chia (*Salvia hispanica* L) Gel Can Be Used as Egg or Oil Replacer in Cake Formulations. *Journal of the American Dietetic Association*. 2010;110(6):946–949. [https://doi.org/ 10.1016/j.jada.2010.03.011](https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.03.011)
26. Vuksan V, Jenkins AL, Dias AG, Lee AS, Jovanovski E, Rogovik AL, et al. Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (*Salvia Hispanica* L.). *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010;64(4):436–438. [https://doi.org/ 10.1038/ejcn.2009.159](https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.159).
27. Bushway AA, Belyea PR, Bushway RJ. Chia Seed as a Source of Oil, Polysaccharide, and Protein. *Journal of Food Science*. 1981;46(5):1349–1350. [https://doi.org/ 10.1111/j.1365-2621.1981.tb04171.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb04171.x).
28. Opinion on the safety of ‘Chia seeds (*Salvia hispanica* L.) and ground whole Chia seeds’ as a food ingredient. *European Food Safety Authority Journal*. 2009;7(4):996. [https://doi.org/ 10.2903/j.efsa.2009.996](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.996).
29. Vuksan V, Whitham D, Sievenpiper JL, Jenkins AL, Rogovik AL, Bazinet RP, et al. Supplementation of conventional therapy with the novel grain Salba (*Salvia hispanica* L.) improves major and emerging cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: results of a randomized controlled trial. *Diabetes Care*. 2007;30(11):2804–2810. [https://doi.org/ 10.2337/dc07-1144](https://doi.org/10.2337/dc07-1144)
30. Coorey R, Grant A, Jayasena V. Effects of Chia Flour Incorporation on the Nutritive Quality and Consumer Acceptance of Chips. *Journal of Food Research*. 2012;1(4):85–95. [https://doi.org/ 10.5539/jfr.v1n4p85](https://doi.org/10.5539/jfr.v1n4p85).
31. Attalla NR, El-Hussieny EA. Characteristics of Nutraceutical Yoghurt Mousse Fortified with Chia Seeds. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*. 2017;2(4):2033–2046. [https://doi.org/ 10.22161/ijeab/2.4.61](https://doi.org/10.22161/ijeab/2.4.61).
32. Heuer B, Yaniv Z, Ravina I. Effect of late salinization of chia (*Salvia hispanica*), stock (*Matthiola tricuspidata*) and evening primrose (*Oenothera biennis*) on their oil content and quality. *Industrial Crops and Products*. 2002;15(2):163–167. [https://doi.org/ 10.1016/S0926-6690\(01\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(01)00107-8).

33. Jeong SK, Park HJ, Park BD, Kim I-H. Effectiveness of Topical Chia Seed Oil on Pruritus of End-stage Renal Disease (ESRD) Patients and Healthy Volunteers. *Annals of Dermatology*. 2010;22(2):143–148. [https://doi.org/ 10.5021/ad.2010.22.2.143](https://doi.org/10.5021/ad.2010.22.2.143).
34. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *Journal of the American College of Nutrition*. 2002;21(6):495–505. [https://doi.org/ 10.1080/07315724.2002.10719248](https://doi.org/10.1080/07315724.2002.10719248).
35. Poudyal H, Panchal SK, Waanders J, Ward L, Brown L. Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012;23(2):153–162. [https://doi.org/ 10.1016/j.jnutbio.2010.11.011](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.11.011).
36. Rodea-González DA, Cruz-Olivares J, Román-Guerrero A, Rodríguez-Huezo ME, Vernon-Carter EJ, Pérez-Alonso C. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*. 2012;111(1):102–109. [https://doi.org/ 10.1016/j.jfoodeng.2012.01.020](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.020).
37. Chicco AG, D'Alessandro ME, Hein GJ, Oliva ME, Lombardo YB. Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in alpha-linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. *The British Journal of Nutrition*. 2009;101(1):41–50. [https://doi.org/ 10.1017/S000711450899053X](https://doi.org/10.1017/S000711450899053X).
38. Antruejo A, Azcona JO, Garcia PT, Gallinger C, Rosmini M, Ayerza R, et al. Omega-3 enriched egg production: the effect of α -linolenic ω -3 fatty acid sources on laying hen performance and yolk lipid content and fatty acid composition. *British Poultry Science*. 2011;52(6):750–760. [https://doi.org/ 10.1080/00071668.2011.638621](https://doi.org/10.1080/00071668.2011.638621)
39. Ayerza R, Coates W, Lauria M. Chia seed (*Salvia hispanica* L.) as an omega-3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. *Poultry Science*. 2002;81(6):826–837. [https://doi.org/ 10.1093/ps/81.6.826](https://doi.org/10.1093/ps/81.6.826).
40. Segura-Campos MR, Salazar-Vega IM, Chel-Guerrero LA, Betancur-Ancona DA. Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their

- incorporation into functional foods. *LWT - Food Science and Technology*. 2013;50(2):723–731. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.017>.
41. Ciftci ON, Przybylski R, Rudzińska M. Lipid components of flax, perilla, and chia seeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2012;114(7):794–800. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100207>.
 42. Reyes-Caudillo E, Tecante A, Valdivia-López MA. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*. 2008;107(2):656–663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.062>
 43. Salgado-Cruz Ma de la P, Calderón-Domínguez G, Chanona-Pérez J, Farrera-Rebollo RR, Méndez-Méndez JV, Díaz-Ramírez M. Chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage release characterisation. A microstructural and image analysis study. *Industrial Crops and Products*. 2013;51:453–462. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.036>
 44. Timilsena YP, Adhikari R, Kasapis S, Adhikari B. Molecular and functional characteristics of purified gum from Australian chia seeds. *Carbohydrate Polymers*. 2016;136:128–136. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.035>
 45. de Campo C, Dos Santos PP, Costa TMH, Paese K, Guterres SS, Rios A de O, et al. Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*. 2017;234:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.153>.
 46. Muñoz Hernández L. Mucilage from chia seeds (*Salvia hispanica*): microstructure, physico-chemical characterization and applications in food industry. Thesis. 2012. <https://repositorio.uc.cl/handle/11534/1889>.
 47. Acevedo MJ, Garay ALA, Marin FMFDJ, Nevero MJA, Tamez RMDS. Method for obtaining mucilage from salvia hispanica l. WO2008044908A3, 2008. <https://patents.google.com/patent/WO2008044908A3/en>
 48. Castejón N, Luna P, Señoráns FJ. Ultrasonic Removal of Mucilage for Pressurized Liquid Extraction of Omega-3 Rich Oil from Chia Seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal*

- of Agricultural and Food Chemistry. 2017;65(12):2572–2579.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05726>
49. Zhao X, Qiao L, Wu A-M. Effective extraction of Arabidopsis adherent seed mucilage by ultrasonic treatment. Scientific Reports. 2017;7:40672.
<https://doi.org/10.1038/srep40672>.
 50. BTO SAS. Ultratecno France, le nettoyage par ultrasons, comment ça marche.
<https://www.nettoyage.solutions/les-ultrasons/>
 51. Lin K-Y, Daniel JR, Whistler RL. Structure of chia seed polysaccharide exudate. Carbohydrate Polymers. 1994;23(1):13–18. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90085-X](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90085-X).
 52. Rinaudo M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. Food Hydrocolloids. 2001;15(4):433–440.
[https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00041-8)
 53. Fernandez I, Vidueiros SM, Ayerza R, Coates W, Pallaro A. Impact of chia (*Salvia hispanica* L.) on the immune system: preliminary study. Proceedings of the Nutrition Society. 2008;67(OCE):E12. <https://doi.org/10.1017/S0029665108006216>
 54. Capitani MI, Spotorno V, Nolasco SM, Tomás MC. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. LWT - Food Science and Technology. 2012;45(1):94–102.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.012>.
 55. Doublier J-L, Garnier C, Cuvelier G. Gums and Hydrocolloids: Functional Aspects. In: Carbohydrates in Food. Eliasson, A.-C. New York; 2006. p. 233–272. (Taylor & Francis Group). Available from: <https://www.taylorfrancis.com/>
 56. Harris DJ. A Revision of the Irvingiaceae in Africa. Bulletin du Jardin botanique national de Belgique / Bulletin van de National Plantentuin van België. 1996;65(1/2):143–196.
<https://doi.org/10.2307/3668184>
 57. Agbor L. Marketing trends and potentials for *Irvingia gabonensis* products in Nigeria. 1994; Ibdan Nigeria.

58. Emejulu AA, Alisi CS, Asiwe ES, Nwaogu LA, Igwe CU, Onwuliri VA. Renal and hepato-protective effect of *Irvingia gabonensis* juice on sodium fluoride-induced toxicity in Wistar rats. 2015; <http://futospace.futo.edu.ng/xmlui/handle/123456789/2556>
59. Lowe AJ, Gillies AC, Wilson J, Dawson IK. Conservation genetics of bush mango from central/west Africa: implications from random amplified polymorphic DNA analysis. *Mol Ecol*. 2000;9(7):831–841.
60. Mateus-Reguengo L, Barbosa-Pereira L, Rembangouet W, Bertolino M, Giordano M, Rojo-Poveda O, et al. Food applications of *Irvingia gabonensis* (Aubry-Lecomte ex. O'Rorke) Baill., the 'bush mango': A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019;1–14. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1646704>.
61. Azokpota P. Technologie de transformation de six espèces forestières prioritaires non ligneuses : Néré, Karité, Baobab, Pommier sauvage et Arbre à pain. Bénin; 2012 p. (PCT/BEN/3303, Bénin,82). (Projet d'Appui à la promotion et à la valorisation des Produits Forestiers Non Ligneux (PA-PFNL)). Report No.: Deuxième rapport de consultation.
62. Sahoré AD, Koffi LB, Kouamé AM. Technical Sheet of *Irvingia gabonensis* Seeds Preparation in Ivory Coast. *American Journal of Food Science and Technology*. 2013;1(3):42–44. <https://doi.org/10.12691/ajfst-1-3-6>.
63. Leakey RRB, Greenwell P, Hall MN, Atangana AR, Ugoro C, Anegbeh PO, et al. Domestication of *Irvingia gabonensis*: 4. Tree-to-tree variation in food-thickening properties and in fat and protein contents of dika nut. *Food Chemistry*. 2005;90(3):365–378. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.012>.
64. FAO. Domestication and commercialization of non-timber forest products in agroforestry systems. 1996.
65. CBFP. The forests of the Congo Basin: A preliminary assessment. CARPE; 2005 p. 33.
66. Etong DI, Mustapha AO, Taleat AA. Physicochemical Properties and Fatty acid composition of Dikanut (*Irvingia Gabonensis*) seed oil. *Research Journal of Chemical Sciences*. 2014;4(12):70–74.

67. Matos L, Nzikou JM, Matouba E, Pandzou-Yembe VN, Guembot Mapepoulou T, Linder M, et al. Studies of *Irvingia gabonensis* Seed Kernels: Oil Technological Applications. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2009;8:151–157. <https://doi.org/10.3923/pjn.2009.151.157>.
68. Omoniyi SA, Idowu MA, Adeola AA, Folorunso AA. Chemical composition and industrial benefits of dikanut (*Irvingia gabonensis*) kernel oil: A review. *Nutrition & Food Science*. 2017;47(5):741–751. <https://doi.org/10.1108/NFS-03-2017-0054>.
69. Silou T, Loumouamou BW, Nsikabaka S, Kinkela T, Nzikou M, Chalard P, et al. Contribution to the Varietal Delimitation of *Irvingia gabonensis* and *Irvingia wombulu* Chemical Composition Variability of Fats Extracted from Kernels. *Journal of Food Technology*. 2011;9(1):36–42. <https://doi.org/10.3923/jftech.2011.36.42>.
70. Yamoneka J, Malumba P, Blecker C, Gindo M, Richard G, Fauconnier M-L, et al. Physicochemical properties and thermal behaviour of African wild mango (*Irvingia gabonensis*) seed fat. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;64(2):989–996. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.035>.
71. Dahouenon-Ahoussi E, Djenontin TS, Codjia DRM, Tchobo FP, Alitonou AG, Dangou J, et al. Morphologie des fruits et quelques caractéristiques physique et chimique de l'huile et des tourteaux de *Irvingia gabonensis* (*Irvingiaceae*). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2012;6(5):2263–2273. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v6i5.32>.
72. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957;226(1):497–509.
73. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959;37(1):911–917. <https://doi.org/10.1139/y59-099>
74. Womeni HM, Ndjouenkeu R, Kapseu C, Mbiapo FT, Parmentier M, Fanni J. Aqueous enzymatic oil extraction from *Irvingia gabonensis* seed kernels. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2008;110(3):232–238. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700172>.

75. Ogunsina BS, Olatunde GA, Adeleye O. Effect of Pre-Treatments on Mechanical Oil Expression from Dika Kernels. *Nigerian Food Journal*. 2014;32(1):1–9. [https://doi.org/10.1016/S0189-7241\(15\)30090-4](https://doi.org/10.1016/S0189-7241(15)30090-4).
76. Ogunsina BS, Bhatnagar A, Indira T, Radha C. The proximate composition of African Bush Mango kernels (*Irvingia gabonensis*) and characteristics of its oil. *Ife Journal of Science*. 2012;14(1):177–183. <https://www.ajol.info/index.php/ij/article/view/131306>
77. Loumouamou BW, Gomoufatan JPM, Silou T, Nzikou JM, Mbaya Gindo GV, Figueredo G, et al. Extraction and Chemical Composition of Seed Kernel Oil from *Irvingia smithii* of Congo Basin. *Advanced Journal of Food Science and Technology*. 2013;5(5):506–513. <https://doi.org/10.19026/ajfst.5.3118>.
78. *Inform*. 2005;16(12):736–737.
79. Ngondi JL, Oben JE, Minka SR. The effect of *Irvingia gabonensis* seeds on body weight and blood lipids of obese subjects in Cameroon. *Lipids in Health and Disease*. 2005;4:12. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-4-12>.
80. Atangana AR, Tchoundjeu Z, Fondoun J-M, Asaah E, Ndoumbe M, Leakey RRB. Domestication of *Irvingia gabonensis*: 1. Phenotypic variation in fruits and kernels in two populations from Cameroon. *Agroforestry Systems*. 2001;53(1):55–64. <https://doi.org/10.1023/A:1012293700774>
81. Essien EA, Akpan AU, Etim UJ, Udoekpo IU. Oil Extraction from Edible Oilseeds; *Irvingia gabonensis*, *Citrullus lanatus* and *Telferia occidentalis* and Evaluation in Metallic Soap Preparation. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*. 2015;6(2):95–104. <https://doi.org/10.9734/IRJPAC/2015/15511>
82. Gunstone FD, Harwood JL. Occurrence and Characterization of Oils and Fats. In: *Lipid Handbook*. F.D. Gunstone, J.L. Harood and A.J. Dijkstra, 3rd edn. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 37–141.
83. Beauchamp E, Rioux V, Legrand P. Acide myristique : nouvelles fonctions de régulation et de signalisation. *Med Sci (Paris)*. 2009;25(1):57–63. <https://doi.org/10.1051/medsci/200925157>

84. Rioux V. Fatty acid acylation of proteins: specific roles for palmitic, myristic and caprylic acids. *Oilseeds & fats Crops and Lipids*. 2016;23(3):D304. <https://doi.org/10.1051/ocl/2015070>
85. Guenic SL, Chaveriat L, Lequart V, Joly N, Martin P. Renewable Surfactants for Biochemical Applications and Nanotechnology. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2019;22(1):5–21. <https://doi.org/10.1002/jsde.12216>
86. Infinium. Biosurfactants Market : Global Industry Analysis, Trends, Market Size and Forecasts up to 2023. Infinium Global Research. 2017; <https://www.infiniumglobalresearch.com/chemical-material/global-biosurfactants-market>
87. Garofalakis G, Murray BS, Sarney DB. Surface Activity and Critical Aggregation Concentration of Pure Sugar Esters with Different Sugar Headgroups. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2000;229(2):391–398. <https://doi.org/10.1002/jsde.12216>
88. Zhang X, Song F, Taxipalati M, Wei W, Feng F. Comparative Study of Surface-Active Properties and Antimicrobial Activities of Disaccharide Monoesters. *PLOS ONE*. 2014;9(12):e114845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114845>
89. Sultani S, Ognier S, Engasser J-M, Ghoul M. Comparative study of some surface active properties of fructose esters and commercial sucrose esters. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2003;227(1):35–44. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(03\)00360-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00360-1)
90. Sefha F, Abouseoud M. Biocatalytic acylation of glucose by immobilized Ricinus Communis lipase. *Moroccan Journal of Chemistry*. 2016;4(4):1084–1095.
91. Olive G, Torezan GAP, Blecker C. Synthèse enzymatique d'esters de fructose. *Comptes Rendus Chimie*. 2012;15(11–12):1037–1047. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2012.09.002>
92. Zheng Y, Zheng M, Ma Z, Xin B, Guo R, Xu X. Sugar Fatty Acid Esters. In: Ahmad MU, Xu X, editors. *Polar Lipids*. Urbana, Illinois: AOCS Press; 2015. p. 215–243.
93. Griffin WC. Classification of surface-active agents by 'HLB'. *Journal of Cosmetic Science*. 1949;1(5):311–326. <http://journal.sconline.org/contents/cc1949/cc001n05.html>

94. Liang M-Y, Chen Y, Banwell MG, Wang Y, Lan P. Enzymatic Preparation of a Homologous Series of Long-Chain 6-O-Acylglucose Esters and Their Evaluation as Emulsifiers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(15):3949–3956. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00913>.
95. Szűts A, Pallagi E, Regdon G, Aigner Z, Szabó-Révész P. Study of thermal behaviour of sugar esters. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;336(2):199–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.053>
96. Ferrer M, Cruces MA, Bernabé M, Ballesteros A, Plou FJ. Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999;65(1):10–6. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19991005\)65:1<10::AID-BIT2>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19991005)65:1<10::AID-BIT2>3.0.CO;2-L)
97. Madsen T, Petersen G, Seierø C, Tørsløv J. Biodegradability and aquatic toxicity of glycoside surfactants and a nonionic alcohol ethoxylate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1996;73(7):929–233. <https://doi.org/10.1007/BF02517997>.
98. Plat T, Linhardt RJ. Syntheses and applications of sucrose-based esters. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2001;4(4):415–421. <https://doi.org/10.1007/s11743-001-0196-y>.
99. AlFindee MN, Zhang Q, Subedi YP, Shrestha JP, Kawasaki Y, Grilley M, et al. One-step synthesis of carbohydrate esters as antibacterial and antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;26(3):765–774. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.038>
100. Ferrer M, Soliveri J, Plou FJ, López-Cortés N, Reyes-Duarte D, Christensen M, et al. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005;36(4):391–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.02.009>
101. Okabe S, Suganuma M, Tada Y, Ochiai Y, Sueoka E, Kohya H, et al. Disaccharide esters screened for inhibition of tumor necrosis factor-alpha release are new anti-cancer agents. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*. 1999;90(6):669–676. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1999.tb00799.x>.

102. Puterka GJ, Farone W, Palmer T, Barrington A. Structure-function relationships affecting the insecticidal and miticidal activity of sugar esters. *Journal of Economic Entomology*. 2003;96(3):636–644. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-96.3.636>.
103. Devulapalle KS, Gómez de Segura A, Ferrer M, Alcalde M, Mooser G, Plou FJ. Effect of carbohydrate fatty acid esters on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase activity. *Carbohydrate Research*. 2004;339(6):1029–1034. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.01.007>
104. Akoh CC, Decker DEA. Lipid-based fat substitutes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1995;35(5):405–430. <https://doi.org/10.1080/10408399509527707>
105. Akoh CC. Lipid-Based Synthetic Fat Substitutes. In: *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. 2nd Edition. New York, NY: CRC Press; 2002. p. 695–727.
106. Ma Y-R, Banwell MG, Yan R, Lan P. Comparative Study of the Emulsifying Properties of a Homologous Series of Long-Chain 6'-O-Acylmaltose Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(33):8832–8840. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02391>
107. Watanabe T, Katayama S, Matsubara M, Honda Y, Kuwahara M. Antibacterial carbohydrate monoesters suppressing cell growth of *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose. *Current Microbiology*. 2000;41(3):210–213. <https://doi.org/10.1007/s002840010121>.
108. Ballesteros A, Plou F, Alcalde M, Ferrer M, García-Arellano H, Reyes-Duarte D, et al. Enzymatic Synthesis of Sugar Esters and Oligosaccharides from Renewable Resources. In: *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. CRC Press; 2006. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420019377.ch17>.
109. Chang SW, Shaw JF. Biocatalysis for the production of carbohydrate esters. *New Biotechnology*. 2009;26(3):109–116. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.07.003>
110. Coulon D, Girardin M, Ghoul M. Enzymic synthesis of fructose monooleate in a reduced pressure pilot scale reactor using various acyl donors. *Process Biochemistry*. 1999;34(9):913–918. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00019-9)

111. Degn P, Pedersen LH, Duus J ø, Zimmermann W. Lipase-catalysed synthesis of glucose fatty acid esters in tert-butanol. *Biotechnology Letters*. 1999;21(4):275–280. <https://doi.org/10.1023/A:1005439801354>
112. Gumel AM, Annuar MSM, Heidelberg T, Chisti Y. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochemistry*. 2011;46(11):2079–2090. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.021>
113. Inprakhon P, Wongthongdee N, Amornsakchai T, Pongtharankul T, Sunintaboon P, Wiemann LO, et al. Lipase-catalyzed synthesis of sucrose monoester: Increased productivity by combining enzyme pretreatment and non-aqueous biphasic medium. *Journal of Biotechnology*. 2017;259:182–190. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.021>
114. Méline T, Muzard M, Deleu M, Rakotoarivonina H, Plantier-Royon R, Rémond C. D-Xylose and L-arabinose laurate esters: Enzymatic synthesis, characterization and physico-chemical properties. *Enzyme and Microbial Technology*. 2018;112:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.01.008>
115. Neta NS, Teixeira JA, Rodrigues LR. Sugar Ester Surfactants: Enzymatic Synthesis and Applications in Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015;55(5):595–610. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.667461>
116. Piccicuto S, Blecker C, Deroanne C, Brohee J-C, Mbampara A, Lognay G, et al. Les esters de sucres : voies de synthèse et potentialités d'utilisation. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 2001;5(4):209–219.
117. Ren K, Lamsal BP. Synthesis of some glucose-fatty acid esters by lipase from *Candida antarctica* and their emulsion functions. *Food Chemistry*. 2017;214:556–563. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.031>
118. Ye R, Hayes DG, Burton R. Effects of Particle Size of Sucrose Suspensions and Pre-incubation of Enzymes on Lipase-Catalyzed Synthesis of Sucrose Oleic Acid Esters. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 2014;91(11):1891–1901. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2537-8>

119. Ganske F, Bornscheuer UT. Lipase-Catalyzed Glucose Fatty Acid Ester Synthesis in Ionic Liquids. *Organic Letters*. 2005;7(14):3097–3098. <https://doi.org/10.1021/ol0511169>
120. Adachi S, Kobayashi T. Synthesis of esters by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005;99(2):87–94. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.87>
121. Tsukamoto J, Haebel S, Valença GP, Peter MG, Franco TT. Enzymatic direct synthesis of acrylic acid esters of mono- and disaccharides. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2008;83(11):1486–492. <https://doi.org/10.1002/jctb.1983>
122. Ye R, Hayes DG. Lipase-Catalyzed Synthesis of Saccharide-Fatty Acid Esters Utilizing Solvent-Free Suspensions: Effect of Acyl Donors and Acceptors, and Enzyme Activity Retention. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2012;89(3):455–463. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1919-4>
123. Du L-H, Luo X-P. Lipase-catalyzed regioselective acylation of sugar in microreactors. *RSC Advances*. 2012;2(7):2663–2665. <https://doi.org/10.1039/C2RA01112C>
124. Reyes-Duarte D, López-Cortés N, Ferrer M, Plou FJ, Ballesteros A. Parameters affecting productivity in the lipase-catalysed synthesis of sucrose palmitate. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2005;23(1):19–27. <https://doi.org/10.1080/10242420500071763>
125. Cao L, Bornscheuer UT, Schmid RD. Lipase-Catalyzed Solid Phase Synthesis of Sugar Esters. *Lipid / Fett*. 1996;98(10):332–335. <https://doi.org/10.1002/lipi.19960981003>
126. Šabeder S, Habulin M, Knez Ž. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Food Engineering*. 2006;77(4):880–886. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.016>
127. Ye R, Pyo S-H, Hayes DG. Lipase-Catalyzed Synthesis of Saccharide-Fatty Acid Esters Using Suspensions of Saccharide Crystals in Solvent-Free Media. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2010;87(3):281–293. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1504-2>

128. Ye R, Hayes DG. Optimization of the Solvent-Free Lipase-Catalyzed Synthesis of Fructose-Oleic Acid Ester Through Programming of Water Removal. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2011;88(9):1351–1359. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1791-2>
129. van den Broek LAM, Boeriu CG. Enzymatic synthesis of oligo- and polysaccharide fatty acid esters. *Carbohydrate Polymers*. 2013;93(1):65–72. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.051>.
130. Tarahomjoo S, Alemzadeh I. Surfactant production by an enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003;33(1):33–37. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00085-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00085-1)
131. Pappalardo VM, Boeriu CG, Zaccheria F, Ravasio N. Synthesis and characterization of arabinose-palmitic acid esters by enzymatic esterification. *Molecular Catalysis*. 2017;433:383–390. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2017.02.029>
132. Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2014;2(5):1063–1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
133. Rogers RD, Seddon KR. Ionic Liquids-Solvents of the Future? *Science*. 2003;302(5646):792–793. <https://doi.org/10.1126/science.1090313>
134. Seddon KR. Ionic Liquids for Clean Technology. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 1997;68(4):351–6. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199704\)68:4<351::AID-JCTB613>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199704)68:4<351::AID-JCTB613>3.0.CO;2-4)
135. Smith EL, Abbott AP, Ryder KS. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*. 2014;114(21):11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
136. Vanda H, Dai Y, Wilson EG, Verpoorte R, Choi YH. Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Compte Rendu Chimie*. 2018;21(6):628–638. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.04.002>

137. Zhang Q, Vigier KDO, Royer S, Jérôme F. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(21):7108–7146. <https://doi.org/10.1039/C2CS35178A>
138. Findrik Z, Megyeri G, Gubicza L, Bélafi-Bakó K, Nemestóthy N, Sudar M. Lipase catalyzed synthesis of glucose palmitate in ionic liquid. *Journal of Cleaner Production*. 2016;112:1106–1111. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.07.098>
139. Mai NL, Ahn K, Bae SW, Shin DW, Morya VK, Koo Y-M. Ionic liquids as novel solvents for the synthesis of sugar fatty acid ester. *Biotechnol J*. 2014;9(12):1565–1572. <https://doi.org/10.1002/biot.201400099>
140. Yang Z, Huang Z-L. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in ionic liquids. *Catalysis Science & Technology*. 2012;2(9):1767–1775. <https://doi.org/10.1039/C2CY20109G>
141. Lin X-S, Zou Y, Zhao K-H, Yang T-X, Halling P, Yang Z. Tetraalkylammonium Ionic Liquids as Dual Solvents–Catalysts for Direct Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters. *J Surfact Deterg*. 2016;19(3):511–517. <https://doi.org/10.1007/s11743-016-1798-7>
142. Lin X-S, Wen Q, Huang Z-L, Cai Y-Z, Halling PJ, Yang Z. Impacts of ionic liquids on enzymatic synthesis of glucose laurate and optimization with superior productivity by response surface methodology. *Process Biochemistry*. 2015;50(11):1852–1858. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.019>
143. Lin X-S, Zou Y, Zhao K-H, Yang T-X, Halling P, Yang Z. Tetraalkylammonium Ionic Liquids as Dual Solvents–Catalysts for Direct Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2016;19(3):511–517. <https://doi.org/10.1007/s11743-016-1798-7>
144. Dai Y, van Spronsen J, Witkamp G-J, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*. 2013;766:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
145. Craveiro R, Aroso I, Flammia V, Carvalho T, Viciosa MT, Dionísio M, et al. Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*. 2016;215:534–540. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.01.038>

146. Hayyan A, Mjalli FS, AlNashef IM, Al-Wahaibi YM, Al-Wahaibi T, Hashim MA. Glucose-based deep eutectic solvents: Physical properties. *Journal of Molecular Liquids*. 2013;178:137–141. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.11.025>
147. Zhao K-H, Cai Y-Z, Lin X-S, Xiong J, Halling PJ, Yang Z. Enzymatic synthesis of glucose-based fatty acid esters in bisolvent systems containing ionic liquids or deep eutectic solvents. *Molecules*. 2016;21(10):1294. <https://doi.org/10.3390/molecules21101294>
148. Pöhnlein M, Ulrich J, Kirschhöfer F, Nusser M, Muhle-Goll C, Kannengiesser B, et al. Lipase-catalyzed synthesis of glucose-6-O-hexanoate in deep eutectic solvents. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2015;117(2):161–166. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400459>
149. Lores H, Romero V, Costas I, Bendicho C, Lavilla I. Natural deep eutectic solvents in combination with ultrasonic energy as a green approach for solubilisation of proteins: application to gluten determination by immunoassay. *Talanta*. 2017;162:453–459. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.078>
150. Imperato G, Höger S, Lenoir D, König B. Low melting sugar–urea–salt mixtures as solvents for organic reactions—estimation of polarity and use in catalysis. *Green Chemistry*. 2006;8(12):1051–1055. <https://doi.org/10.1039/B603660K>
151. Xiao Y, Wu Q, Cai Y, Lin X. Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. *Carbohydrate Research*. 2005;340(13):2097–2103. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.06.027>
152. Huang D, Jiang X, Zhu H, Fu X, Zhong K, Gao W. Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters under ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2010;17(2):352–355. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.08.009>
153. Prabhakar S, Vivès T, Ferrières V, Benvegna T, Legentil L, Lemiègre L. A fully enzymatic esterification/transesterification sequence for the preparation of symmetrical and unsymmetrical trehalose diacyl conjugates. *Green Chemistry*. 2017;19(4):987–95. <https://doi.org/10.1039/C6GC02680J>

154. Nagai Y, Kuzui H, Kiyokawa A. Sucrose fatty acid ester with low degree of substitution and process for producing the same. EP1813622A1, 2007. <https://patents.google.com/patent/EP1813622A1/fr?q=~patent%2fUS8329894B2&before=priority:20180101&after=priority:19980101>
155. Schaefer JJ, Trout JE. Staged synthesis of purified, partially esterified polyol polyester fatty acid compositions. EP1507786B1, 2009. <https://patents.google.com/patent/EP1507786B1/en?q=~patent%2fUS8329894B2&before=priority:20180101&after=priority:19980101&page=2>
156. Wang MY. Production of sugar esters from vinyl fatty acid esters. WO2007082149A1, 2007. <https://patents.google.com/patent/WO2007082149A1/en?q=~patent%2fUS8329894B2&before=priority:20180101&after=priority:19980101>
157. Cruces MA, Plou FJ, Ferrer M, Bernabé M, Ballesteros A. Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2001;78(5):541–546. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0300-5>
158. James K, Smith JF. Process for the production of esters of sugars and sugar derivatives. EP2019833B1, 2010. <https://patents.google.com/patent/EP2019833B1/fr?q=~patent%2fUS8329894B2>
159. Jo I-H. Preparation of aliphatic acid ester of carbohydrate. EP1355914A4, 2005. <https://patents.google.com/patent/EP1355914A4/en?q=~patent%2fUS8329894B2&before=priority:20180101&after=priority:19980101>
160. Claverie V, Cecutti C, Mouloungui Z, Gaset A, Ferrenbach CLH. Method for producing carbohydrate partial esters. US6706877B1, 2004.
161. Mouloungui Z, Delmas M, Gaset A. The Wittig-Horner reaction in weakly hydrated solid/liquid media: structure and reactivity of carbanionic species formed from ethyl (diethyl phosphono)acetate by adsorption on solid inorganic bases. *The Journal of Organic Chemistry*. 1989;54(16):3936–3941. <https://doi.org/10.1021/jo00277a035>
162. Climent MS, Marinas JM, Mouloungui Z, Le Bigot Y, Delmas M, Gaset A, et al. Barium(II) hydroxide as catalyst in organic reactions. 20. Structure-catalytic activity

- relationship in the Wittig reaction. *The Journal of Organic Chemistry*. 1989;54(15):3695–3701. <https://doi.org/10.1021/jo00276a035>
163. Le HFC, Beuche M, Roussel M. Method for producing carbohydrate partial esters. EP1811951B1, 2011. <https://patents.google.com/patent/EP1811951B1/en?q=EP1811951B1>
164. Zhao R, Chang Z, Jin Q, Li W, Dong B, Miao X. Heterogeneous base catalytic transesterification synthesis of sucrose ester and parallel reaction control. *International Journal of Food Science & Technology*. 2014;49(3):854–860. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12376>
165. Mouloungui Z, Mechling E. Process for the preparation of fatty acids by in situ hydrolysis of the lipids contained in the seeds of a plant. WO2004022677A1, 2004. <https://patents.google.com/patent/WO2004022677A1/ar>
166. Romain V, Ngakegni-Limbili AC, Mouloungui Z, Ouamba J-M. Thermal Properties of Monoglycerides from *Nephelium Lappaceum* L. Oil, as a Natural Source of Saturated and Monounsaturated Fatty Acids. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2013;52(39):14089–14098. <https://doi.org/10.1021/ie401875v>
167. Sriperm N, Pesti GM, Tillman PB. Evaluation of the fixed nitrogen-to-protein (N:P) conversion factor (6.25) versus ingredient specific N:P conversion factors in feedstuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011;91(7):1182–1186. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4292>
168. Mosse J. Nitrogen-to-protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1990;38(1):18–24. <https://doi.org/10.1021/jf00091a004>
169. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*. 1973;54(2):484–489. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90377-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1)
170. Silversand C, Haux C. Improved high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids. *Journal of*

- Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1997;703(1):7–14.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00385-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00385-X)
171. Alamgir ANM. Phytoconstituents-Active and Inert Constituents, Metabolic Pathways, Chemistry and Application of Phytoconstituents, Primary Metabolic Products, and Bioactive Compounds of Primary Metabolic Origin. In: Alamgir ANM. Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: Volume 2: Phytochemistry and Bioactive Compounds. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 25–164. (Progress in Drug Research). https://doi.org/10.1007/978-3-319-92387-1_2
172. Nitrayová S, Brestenský M, Heger J, Patráš P, Rafay J, Sirotkin A. Amino acids and fatty acids profile of chia (*Salvia hispanica* L.) and flax (*Linum usitatissimum* L.) seed. Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. 2014;8(1):72–76. <https://doi.org/10.5219/332>
173. Fabre J-F, Lacroux E, Cerny M, Mouloungui Z. Barriers to the release of flaxseed oil bodies and ways of overcoming them. Oilseeds & fats Crops and Lipids. 2015;22(6):D607. <https://doi.org/10.1051/ocl/2015058>
174. Fabre J-F, Lacroux E, Gravé G, Mouloungui Z. Extraction of camelina mucilage with ultrasound and high flow rate fluid circulation. Industrial Crops and Products. 2020;144:112057. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112057>
175. Ifeduba EA, Awachie MN, Sabir JSM, Akoh CC. Fatty Acid Composition of *Irvingia gabonensis* and *Treculia africana* Seed Lipids and Phospholipids. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2013;90(4):517–528. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2199-3>
176. Ogodó AC. Physical and Chemical Characteristics of the African Bush Mango (*Irvingia Gabonensis* Var *Garbonensis*) Seed Oil. 2014;1(6):28-31
177. Silou T. Corps gras non conventionnels du Bassin du Congo : Caractérisation, biodiversité et qualité. Oilseeds & fats Crops and Lipids. 2014;21(2):D209. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013044>
178. Douniama-Lönn GV, Ngagegni-Limbili AC, Valentin R, Nsamoto H, Cerny M, Mouloungui Z, et al. Fractionability of saturated and unsaturated fatty acid concentrates

- of rambutan oil with a freeze-thaw cold crystallization procedure. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2020;44(4):e14396. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14396>
179. Sonwai S, Ponprachanuvut P. Characterization of physicochemical and thermal properties and crystallization behavior of krabok (*Irvingia Malayana*) and rambutan seed fats. *Journal of Oleo Science*. 2012;61(12):671–679. <https://doi.org/10.5650/jos.61.671>
 180. Yamoneka J, Malumba P, Lognay G, Béra F, Blecker C, Danthine S. Enzymatic Inter-Esterification of Binary Blends Containing *Irvingia gabonensis* Seed Fat to Produce Cocoa Butter Substitute. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2018;120(4):1700423. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700423>
 181. Godard A, Caro P de, Vedrenne E, Mouloungui Z, Thiebaud-Roux S. From crops to products for crops: preserving the ecosystem through the use of bio-based molecules. *OCL*. 2016;23(5):D510. <https://doi.org/10.1051/ocl/2016037>
 182. Mouloungui Z, Lacroux E, Vaca-Garcia C, Peydecastaing J. Destruction des farines animales : Valorisation des fractions lipidiques en biolubrifiants et additifs biocarburants, et du résidu protéique (ou de l'ensemble) pour la fabrication de matériaux polymères. *INRA Productions Animales*. 2004;17:117–22. <https://www6.inra.fr/productions-animales/2004-Volume-17/Numero-HS-2004/Destruction-des-farines-animales>
 183. Benjamin S, Pandey A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*. 1998;14(12):1069–1087. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980915\)14:12<1069::AID-YEA303>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980915)14:12<1069::AID-YEA303>3.0.CO;2-K)
 184. Jahurul MHA, Zaidul ISM, Norulaini NAN, Sahena F, Jinap S, Azmir J, et al. Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics. *Journal of Food Engineering*. 2013;117(4):467–476. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.09.024>
 185. Sa'adiah HAH, Jinap S, Norhayati H. Fractionation of coconut oil via supercritical fluid extraction for production of cocoa butter substitute. *International Food Research Journal*. 2019;26(3):783–790.

186. Oko OJ, Aremu MO, Odoh R, Magomya AM, Abutu D. A Comparative Assessment of the Fatty Acid and Phospholipid Composition of *Irvingia Gabonensis* (African Wild Mango) and *Citrullus Lanatus* (Water Melon) Seed Oils. *Journal of Natural Sciences Research*. 2015;5(18):1–6.
187. Koumba Ibinga SK, Fabre J-F, Bikanga R, Mouloungui Z. Atypical Reaction Media and Organized Systems for the Synthesis of Low-Substitution Sugar Esters. *Front Chem*. 2019;7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00587>
188. Durand E, Lecomte J, Baréa B, Dubreucq E, Lortie R, Villeneuve P. Evaluation of deep eutectic solvent–water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids. *Green Chem*. 2013;15(8):2275–2282. <https://doi.org/10.1039/C3GC40899J>
189. Durand E, Lecomte J, Villeneuve P. Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2013;115(4):379–385. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200416>
190. Pomin VH. Unravelling Glycobiology by NMR Spectroscopy. *Glycosylation*. 2012; <https://doi.org/10.5772/48136>
191. Allen DK, Tao BY. Synthesis and characterization of maltose fatty acid monoesters as biosurfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2002;5(3):245–55. <https://doi.org/10.1007/s11743-002-0224-y>
192. Eychenne V, Mouloungui Z. High concentration of 1-(3-)monoglycerides by direct partial esterification of fatty acids with glycerol. *Lipid / Fett*. 1999;101(11):424–427. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4133\(199911\)101:11<424::AID-LIPI424>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4133(199911)101:11<424::AID-LIPI424>3.0.CO;2-8)
193. Manabe K, Sun X-M, Kobayashi S. Dehydration Reactions in Water. Surfactant-Type Brønsted Acid-Catalyzed Direct Esterification of Carboxylic Acids with Alcohols in an Emulsion System. *Journal of the American Chemical Society*. 2001;123(41):10101–10102. <https://doi.org/10.1021/ja016338q>
194. Wallis C, Cerny M, Lacroux E, Mouloungui Z. Recovery of slaughterhouse Animal Fatty Wastewater Sludge by conversion into Fatty Acid Butyl Esters by acid-catalyzed esterification. *Waste Management*. 2017;60:184–190. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.07.003>

195. Wallis C, Cerny M, Lacroux E, Mouloungui Z. Effect of water and lipophilic alcohols or amines on the 4-dodecylbenzenesulfonic acid-catalyzed esterifications, transesterifications, and amidations. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2017;119(9):1600483. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600483>
196. Manabe K, Iimura S, Sun X-M, Kobayashi S. Dehydration Reactions in Water. Brønsted Acid–Surfactant-Combined Catalyst for Ester, Ether, Thioether, and Dithioacetal Formation in Water. *Journal of the American Chemical Society*. 2002;124(40):11971–11978. <http://dx.doi.org/10.1021/ja026241j>
197. Boussambe GNM, Valentin R, Mouloungui Z. Structural Analysis of Partial and Total Esters of Glycerol Undecenoate and Diglycerol Undecenoate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2015;92(11–12):1567–1577. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2725-1>
198. Fabre J-F, Boussambe GNM, Valentin R, Mouloungui Z. Theoretical and Kinetic Analysis of the Esterification of Undecylenic Acid with Glycerol. *Lipids*. 2020; <https://doi.org/10.1002/lipd.12239>
199. Nowicki J, Woch J, Mościpan M, Nowakowska-Bogdan E. Micellar effect on the direct Fischer synthesis of alkyl glucosides. *Applied Catalysis A: General*. 2017;539:13–18. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2017.04.002>
200. Ferrer M, Comelles F, Plou FJ, Cruces MA, Fuentes G, Parra JL, et al. Comparative Surface Activities of Di- and Trisaccharide Fatty Acid Esters. *Langmuir*. 2002;18(3):667–673. <https://doi.org/10.1021/la010727g>.
201. Naran R, Chen G, Carpita NC. Novel Rhamnogalacturonan I and Arabinoxylan Polysaccharides of Flax Seed Mucilage. *Plant Physiology*. 2008;148(1):132–141. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123513>
202. North HM, Berger A, Saez-Aguayo S, Ralet M-C. Understanding polysaccharide production and properties using seed coat mutants: future perspectives for the exploitation of natural variants. *Annals of Botany*. 2014;114(6):1251–1263. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu011>

203. Fedeniuk RW, Biliaderis CG. Composition and Physicochemical Properties of Linseed (*Linum usitatissimum* L.) Mucilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994;42(2):240–247. <https://doi.org/10.1021/jf00038a003>.
204. Togrul H, Arslan N. Flow properties of sugar beet pulp cellulose and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. *Carbohydrate Polymers*. 2003;54(1):63–71. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00146-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00146-2).
205. Sims IM, Smith AM, Morris GA, Ghori MU, Carnachan SM. Structural and rheological studies of a polysaccharide mucilage from lacebark leaves (*Hoheria populnea* A. Cunn.). *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;111:839–847. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.142>.
206. Cerqueira MA, Souza BWS, Simões J, Teixeira JA, Domingues MRM, Coimbra MA, et al. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. *Carbohydrate Polymers*. 2011;83(1):179–185. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.036>.
207. Faccio C, Machado RAF, de Souza LM, Zoldan SR, Quadri MGN. Characterization of the mucilage extracted from jaracatiá (*Carica quercifolia* (A. St. Hil.) Hieron). *Carbohydrate Polymers*. 2015;131:370–376. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.015>.
208. Tristantini D, Yunan A. Advanced characterization of microbeads replacement from cellulose acetate based on empty fruit bunches and dried jackfruit leaves. *E3S Web Conf*. 2018;67:04045. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20186704045>.
209. Cui W, Eskin N a. M, Biliaderis CG. NMR characterization of a water-soluble 1,4-linked beta-D-glucan having ether groups from yellow mustard (*Sinapis alba* L.) mucilage. *Carbohydrate polymers*. 1995;27(2):117-122. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00040-E](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00040-E).
210. Nep EI, Conway BR. Characterization of grewia gum, a potential pharmaceutical excipient. *Journal of Excipients and Food Chemicals*. 2010;1(1):30–40. <http://ojs.abo.fi/index.php/jefc/article/view/12>. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957;226(1):497–509.

Liste des figures

Figure I-1: Plante de chia	26
Figure I-2 : Fleur de chia.....	27
Figure I-3 : Graines de chia.....	27
Figure I-4: Microstructure de la graine de chia : coupure transversale (43).....	32
Figure I-5 : Représentation schématique de la croissance puis l'implosion des bulles de cavitation avec l'onde ultrasonore (50).....	33
Figure I-6 : Coupe transversale du fruit de <i>I. gabonensis</i>	36
Figure I-7 : Diagramme de production d'amande de <i>I. gabonensis</i> (61).....	37
Figure I-8 : Amandes de <i>I. gabonensis</i>	37
Figure I-9 : Représentation schématique d'une molécule tensioactive	49
Figure I-10 : Marché global des biotensioactifs par application, 2017-2023.....	53
Figure I-11 : Tension de surface en fonction de la concentration en tension de surface	55
Figure I-12 : Evolution du nombre de publications sur les liquides ioniques et DES utilisés comme solvants (référence : Web of Science).....	66
Figure I-13 : Exemple de mécanisme de synthèse des ESAG dans un liquide ionique (143) .	67
Figure I-14 : Représentation schématique d'un diagramme de phase avec eutectique (135)...	68
Figure I-15 : Synthèse de l'hexanoate de glucose en présence de DES (148).....	69
Figure I-16 : Synthèse enzymatique des esters de sucre par cavitation US	70
Figure I-17 : Estérification en présence DMSO (156)	72
Figure I-18 : Réaction d'estérification en présence de MEC (154).....	74
Figure I-19 : Synthèse directe des esters de sucre par un procédé sans solvant (158).....	76
Figure I-20 : Diagramme de phase pseudo-quaternaire pour les esters de saccharose réalisés avec le mélange ester méthylique/sucre-H ₂ O/sucroester	80
Figure I-21 : Adsorption des esters méthyliques à la surface de K ₂ CO ₃ (161,162).....	81
Figure I-22 : synthèse d'ester de sucre par un procédé d'émulsification (160)	82
Figure I-23 : Procédé de synthèse d'ester de sucre par un procédé d'émulsification (163)	83
Figure II-1 : Montage de la colonne à ultrasons en mode batch	91
Figure II-2 : Presse monovis utilisée pour le pressage des graines	93
Figure II-3: Courbe de calibration de l'acide galacturonique	97
Figure II-4 : Dispositif de mesure de la viscosité cinématique avec un viscosimètre dans un bain à 40°C.....	98
Figure II-5 : Tensiomètre à goutte automatisé utilisé pour la mesure de la tension de surface	105
Figure III-1 : Schéma de l'extraction du mucilage de chia et de production de graines de chia démucilaginées	110
Figure III-2 : Observation au microscope optique binoculaire d'une graine hydratée colorée au rouge de ruthénium (objectif ×10, échelle 500 μm).....	111
Figure III-3 : Observation des graines de chia au microscope électronique	112
Figure III-4: Evolution du couple et de la température au cours du temps lors de la démucilagination de Muc-030-20	114

Figure III-5 : Evolution du couple et de la température au cours du temps lors de la démucilagination de Muc-017-50	115
Figure III-6 : Composition en acides aminés du mucilage en fonction du temps d'extraction à 20 min (essai Muc-030-20) et 50 min (essai Muc-017-50).....	117
Figure III-7 : Composition en monosaccharides du mucilage en fonction du temps d'extraction.....	118
Figure III-8 : Représentation de Kreamer et Huggins pour la détermination de la viscosité intrinsèque de Muc-017-50	119
Figure III-9 : Thermogramme du mucilage de l'essai Muc-017-50 des graines chia Oruro®	121
Figure III-10 : Schéma du pressage des amandes de <i>I. gabonensis</i>	123
Figure III-11 : Observation des cellules de la graine de <i>I. gabonensis</i>	124
Figure III-12 : Résultats statistiques de la composition en triglycérides	129
Figure III-13 : Courbe de fusion du beurre obtenue par DSC.....	130
Figure III-14 : Thermogramme obtenu par ATG du beurre de <i>I. gabonensis</i>	131
Figure III-15 : Suivi cinétique de l'hydrolyse du beurre de <i>I. gabonensis</i>	132
Figure III-16 : Teneur en SFC des acides gras de <i>I. gabonensis</i>	135
Figure IV-1 : Photographie du montage utilisé pour la synthèse des esters de sucre par transestérification en catalyse basique en milieu DES.....	143
Figure IV-2 : Schéma de synthèse des esters de glucose en milieu eutectique profond par catalyse basique.....	145
Figure IV-3 : Formule semi-développée du chlorure de choline	149
Figure IV-4 : Spectre ¹ H RMN de la choline	150
Figure IV-5 : Spectre ¹³ C RMN de la choline	151
Figure IV-6 : Formule semi-développée des formes anomériques α et β du glucose	152
Figure IV-7 : Spectre ¹ H RMN du glucose	152
Figure IV-8 : Spectre ¹³ C RMN du glucose	153
Figure IV-9 : Formule semi-développée du laurate de méthyle.....	154
Figure IV-10 : Spectre ¹ H RMN du laurate de méthyle.....	154
Figure IV-11 : Spectre ¹³ C RMN du laurate de méthyle.....	155
Figure IV-12 : Spectre ¹ H du brut réactionnel de l'expérience 4.....	157
Figure IV-13: Spectre RMN ¹³ C du brut réactionnel de l'expérience 4.....	158
Figure IV-14 : Structure du carbonate formé avec le glucose.....	159
Figure IV-15: Spectre HMBC du brut réactionnel de l'expérience 4	161
Figure IV-16 : Observation au microscope optique du mélange Glucose/acide myristique (ratio molaire 2/1) en présence de 0,12 équivalent molaire (acquisition $\times 10$).....	164
Figure IV-17 : Mise en évidence de la formation du laurate de glucose (ratio AL/Glc 1:1, en présence de 0,12 équivalent de l'ADBS, 80°C, 8h).....	166
Figure IV-18 : Mise en évidence de la formation du myristate de glucose (ratio AL/Glc 1:1, 0,12 équivalent de l'ADBS, 80°C, 8h).....	167
Figure IV-19 : Mise en évidence de la formation des esters de glucose de <i>I. gabonensis</i> (ratio AL/Glc 1:1, 0,06 équivalent de l'ADBS, 80°C, 8h)	168
Figure IV-20 : Spectre IRTF du milieu réactionnel (ratio AM/Glc 1:2, 0,12 équiv d'ADBS, 80°C, 8h)	169
Figure IV-21 : Spectre IRFT du produit purifié sur colonne séphadex.	170

Figure IV-22 : Structures semi-développées des acides laurique et myristique.....	170
Figure IV-23 : Spectre ¹ H RMN de l'acide myristique dans le DMSO-d ₆	171
Figure IV-24 : Spectre ¹³ C RMN de l'acide myristique dans le DMSO-d ₆	171
Figure IV-25 : Représentation des formes anomères α et β des mono- et diesters de glucose	174
Figure IV-26 : Spectre ¹ H RMN des constituants du brut réactionnel.....	175
Figure IV-27 : Spectre ¹³ C RMN des constituants du brut réactionnel.....	176
Figure IV-28 : Spectre HSQC des constituants du brut réactionnel	177
Figure IV-29 : Spectre HMBC des constituants du brut réactionnel	178
Figure IV-30 : Structures proposées pour les esters de glucose.....	180
Figure IV-31 : Un des schémas théoriques de synthèse de l'ester de glucose.....	181
Figure IV-32 : Agitateurs utilisés pour les réactions d'estérification	183
Figure IV-33: Rendement de synthèse d'esters de glucose en fonction de la nature de l'acide gras	184
Figure IV-34 : Séparation par CCM du système concentré issu de la purification des esters de glucose réalisée sur colonne séphadex.	186
Figure IV-35 : courbes de la tension de surface en fonction de la concentration en ester de glucose.....	187
Figure IV-36 : Indice de stabilité des émulsions des esters de glucose en comparaison avec l'olivem 1000	189
Figure IV-37: Représentation de l'unité de base des polysaccharides du mucilage de chia selon Lin et <i>al</i> (51).....	191
Figure IV-38 : Observation au microscope optique du mélange AGIG/Mucilage en présence d'ADBS (acquisition ×10)	193
Figure IV-39 : Aspects des Muc-030-20 et produits Muc-Es-02 et Muc-Es-03 obtenus après filtration.....	194
Figure IV-40: Spectre IRTF des mucilages Muc-030-20 et Muc-017-50.....	196
Figure IV-41: Spectre IRTF du brut réactionnel Muc-Es-03	197
Figure IV-42 : Spectre IRTF du brut réactionnel Muc-Es-03 obtenu à partir de la réaction entre Muc-030-20 et les AGIG sous cavitation ultrasonore.....	198
Figure IV-43 : Spectre IRTF du mucilage natif Muc-017-50 et du Muc-Es-01	200
Figure IV-44 : Spectre IRTF du mucilage natif Muc-030-20 et du Muc-Es-02	200
Figure IV-45 : Spectre IRTF du mucilage natif Muc-030-20 et du Muc-Es-03	201
Figure IV-46 : Spectre ¹ H RMN du mucilage de chia Muc-017-50	202
Figure IV-47 : Spectre ¹³ C RMN du mucilage Muc-030-20.....	203
Figure IV-48 : Spectre ¹³ C RMN du mucilage Muc-017-50	204
Figure IV-49 : Spectre ¹ H RMN du Muc-030-20, Muc-Es02 et Muc-Es-03	205
Figure IV-50: Spectre ¹³ C RMN du mucilage acylé Muc-Es-02	206
Figure IV-51 : Spectre ¹³ C RMN du mucilage acylé Muc-Es-03	206
Figure IV-52 : Représentation de Kraemer et Huggins pour la détermination de la viscosité intrinsèque	208

Liste des tableaux

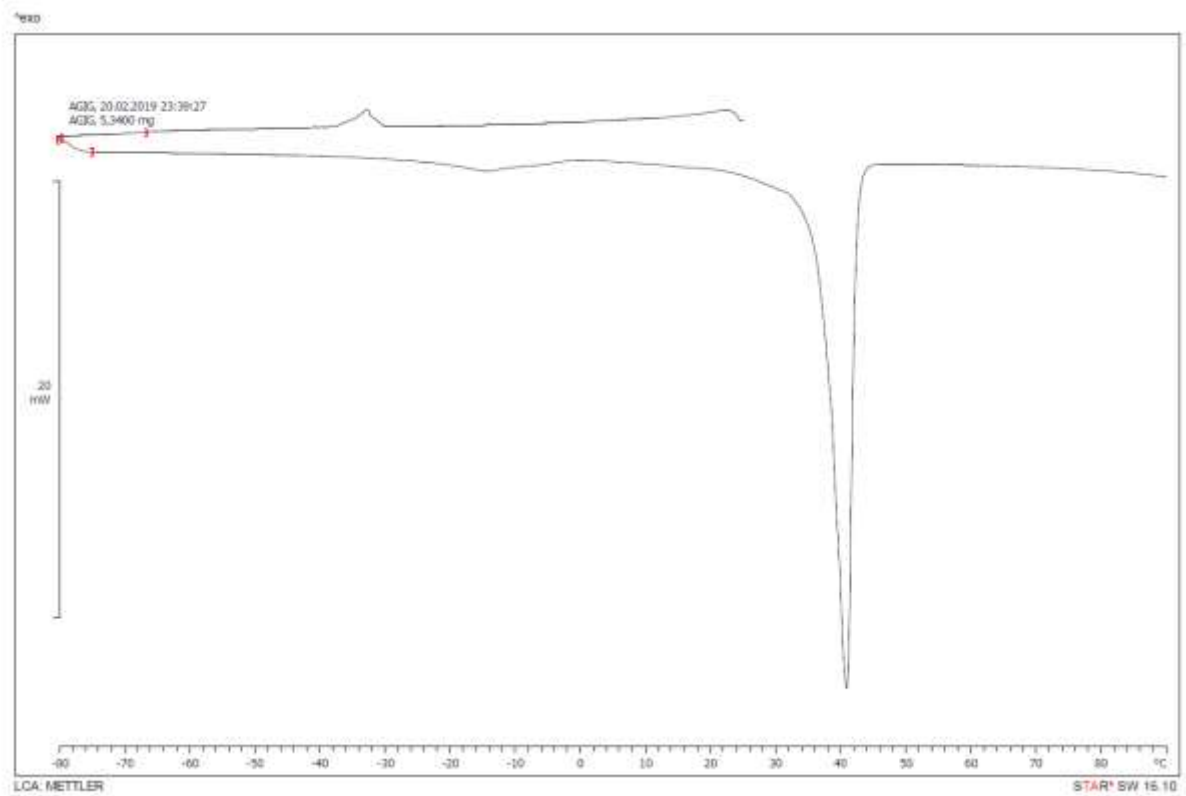
Tableau I-1 : Composés fonctionnels, valeur nutritionnelle, valeur médicinale et fonctionnalité technologique de la graine de chia	30
Tableau I-2: Rendements d'extraction (en %) du beurre extrait de l'amande en fonction de la méthode d'extraction	41
Tableau I-3 : Profil des acides gras du beurre de <i>I. gabonensis</i> déterminé en CPG	42
Tableau I-4 : Acides gras majeurs (en millions de tonnes) dans les huiles et matières grasses et les sources principales	42
Tableau I-5 : Production mondiale des huiles de palmiste et de coco et leurs teneurs en acides laurique et myristique.....	44
Tableau I-6 : Applications esters de saccharose des acides laurique et myristique commercialisés par Ryoto.	46
Tableau I-7 : Applications diverses des esters de saccharose des acides laurique et myristique commercialisés par Ryoto	47
Tableau I-8 : Estimations de tonnages pour les différents segments à horizons 2020 et 2030 (source ADEME).....	52
Tableau I-9 : Tension de surface et concentration micellaire critique d'esters de sucre commerciaux	55
Tableau I-10: Applications des tensioactifs en fonction de la valeur de la HLB.....	57
Tableau I-11 : Exemples d'esters de sucres produits par voie enzymatique	63
Tableau I-12 : Exemples de la synthèse des esters de sucre par voie chimique.....	78
Tableau I-13 : Résultats sur l'étude de la taille des globules des émulsions des esters de saccharose selon la méthode d'agitation.....	81
Tableau I-14 : Exemples de synthèse d'esters de sucre en milieu émulsion/dispersion des esters de sucre par voie chimique.....	84
Tableau II-1 : Données de calibrations des différents monosaccharides	95
Tableau II-2 : Eluants utilisés pour l'analyse des phospholipides par chromatographie.....	102
Tableau II-3 : Gradient d'élution des solvants en fonction du temps	102
Tableau III-1 : Composition en acides aminés dans la graine de chia Oruro®	109
Tableau III-2 : Rendement d'extraction du mucilage de chia en fonction de la méthode d'agitation	113
Tableau III-3: Viscosités intrinsèques des mucilages extraits à différents temps.....	119
Tableau III-4 : Composition relative en acides aminés des amandes de <i>I. gabonensis</i>	126
Tableau III-5 : Rendements d'extraction en fonction de la méthode d'extraction des amandes de <i>I. gabonensis</i>	127
Tableau III-6 : Rendements d'extraction du beurre de <i>I. gabonensis</i> en fonction de la méthode d'extraction.....	127
Tableau III-7 : Profil des acides gras du beurre de <i>I. gabonensis</i>	133
Tableau III-8 : Profil des acides gras de quelques beurres tropicaux.....	134
Tableau III-9 : Composition en phospholipides de <i>I. gabonensis</i>	136
Tableau IV-1 : Aspect des réactifs à température ambiante, T_f et comportement du mélange des réactifs en fonction de la température	144

Tableau IV-2 : Essais de synthèse des esters de glucose par catalyse basique en milieu eutectique	147
Tableau IV-3 : Bilan de matière et taux de conversion du laurate de méthyle (LM).....	148
Tableau IV-4 : séparation par CLHP des constituants de la phase visqueuse du brut réactionnel de l'expérience 1.....	149
Tableau IV-5 : Déplacements chimiques des protons et carbones du chlorure de choline	151
Tableau IV-6 : Déplacements chimiques des protons et carbones du glucose.....	153
Tableau IV-7 : Déplacements chimiques des protons et carbones du laurate de méthyle	155
Tableau IV-8 : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C des esters de glucose décrits dans la littérature	160
Tableau IV-9 : Déplacements chimiques de l'acide myristique et des esters de glucose	173
Tableau IV-10 : Rendement de synthèse en fonction du rapport molaire.....	182
Tableau IV-11: Rendement de synthèse des esters de glucose selon la méthode d'agitation	184
Tableau IV-12 : Tension de surface et CMC des esters de glucose.....	188
Tableau IV-13 : Paramètres d'étude pour la mise au point des protocoles de synthèse des esters de mucilage et d'acide gras de <i>I. gabonensis</i>	194
Tableau IV-14 : Bandes d'absorption IRTF du mucilage de chia natif	196
Tableau IV-15 : Composition des mucilages natifs Muc-030-20 et Muc-017-50	199
Tableau IV-16 : Viscosité intrinsèque du mucilage et du mucilage acylé	208

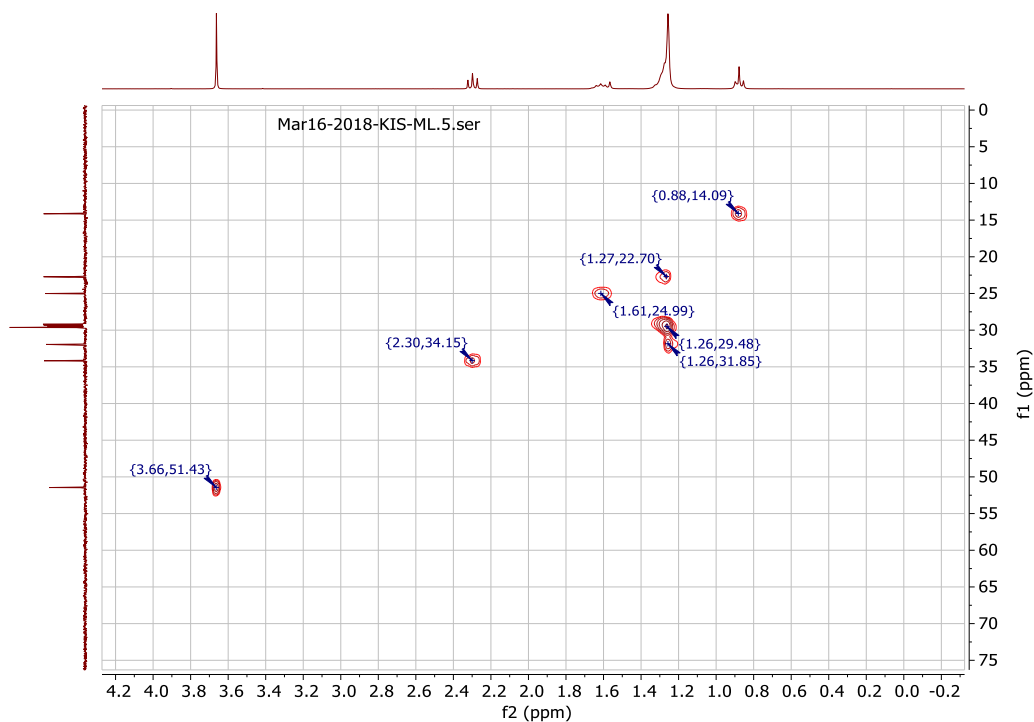
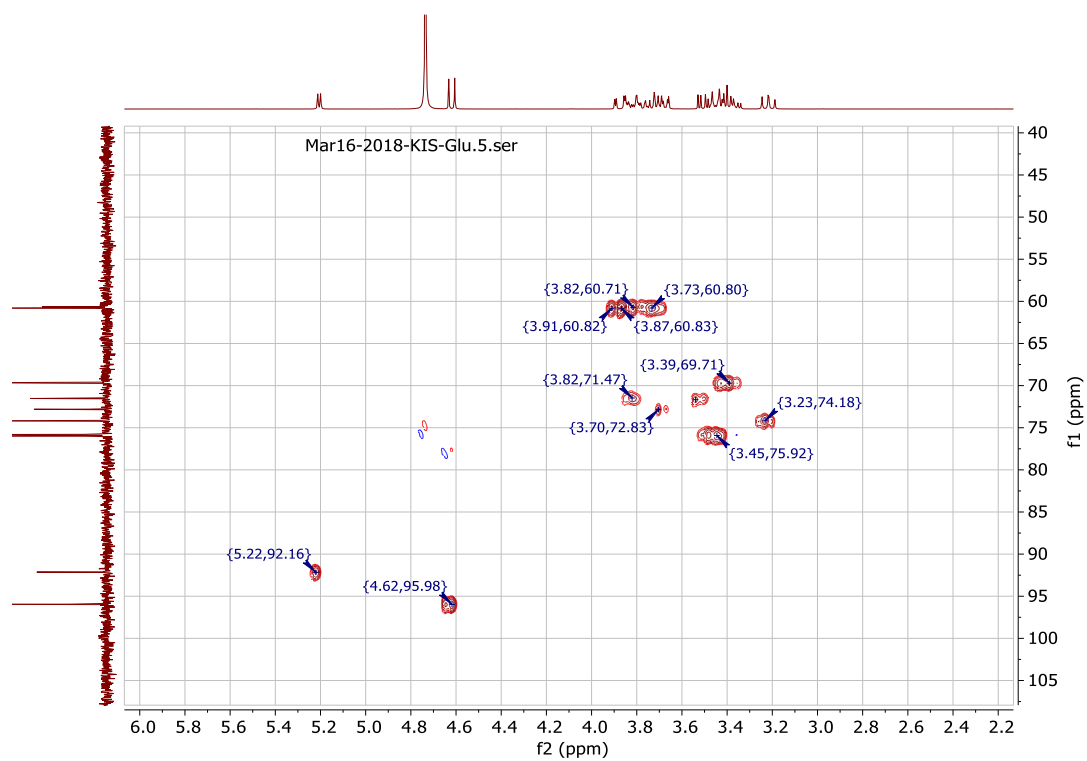
Annexe

Annexe I

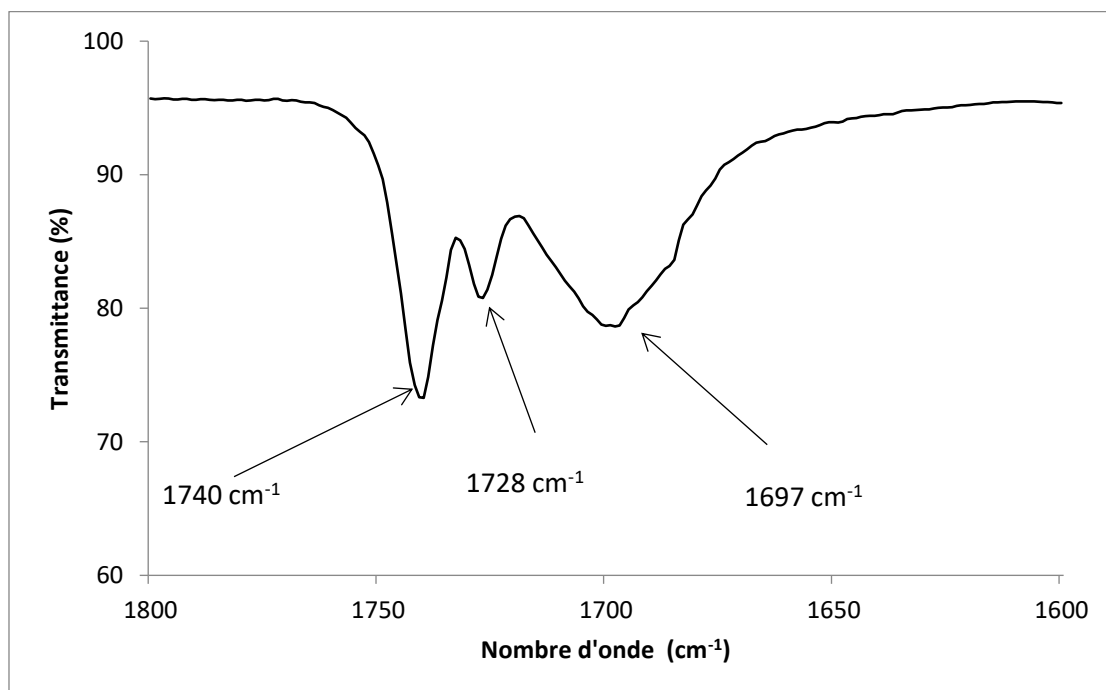
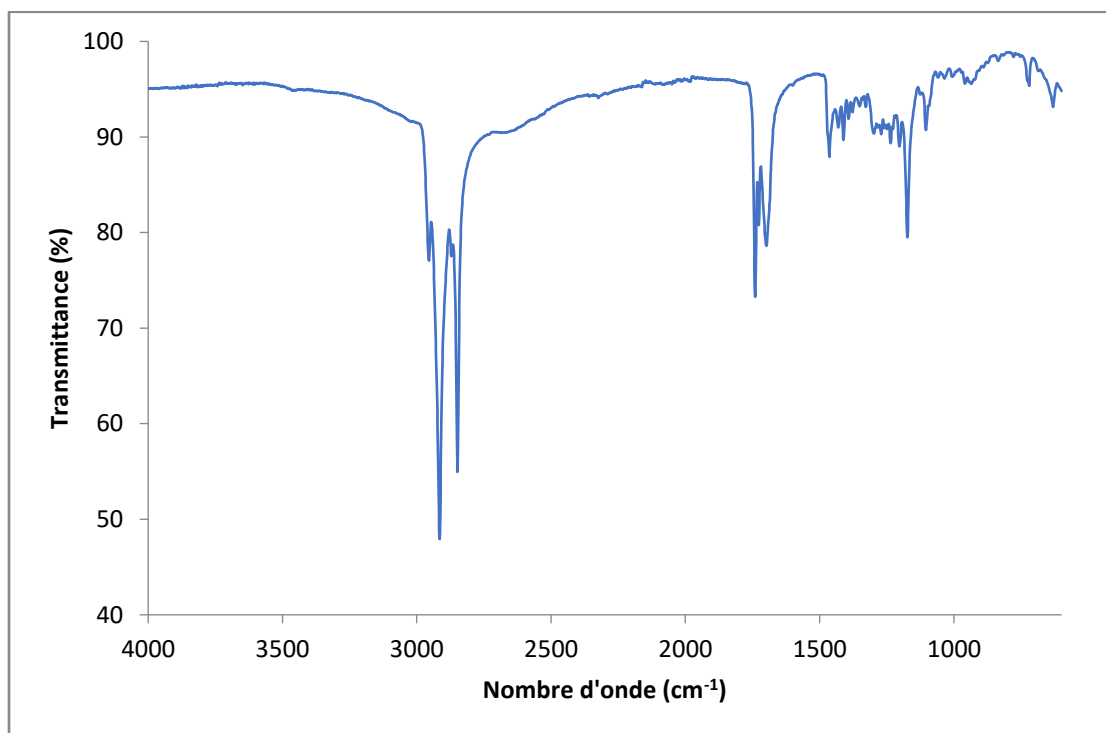
AI.1 : Courbe de fusion des acides gras de *I. gabonensis*



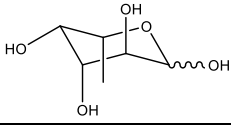
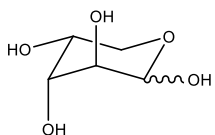
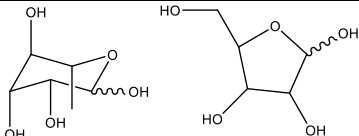
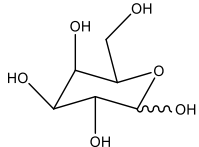
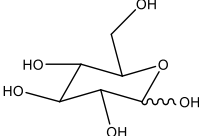
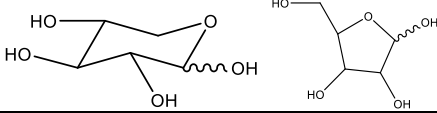
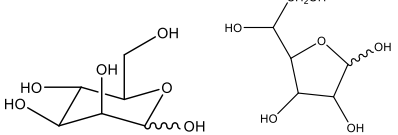
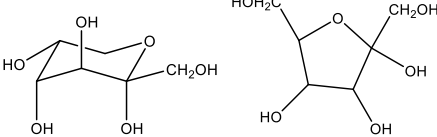
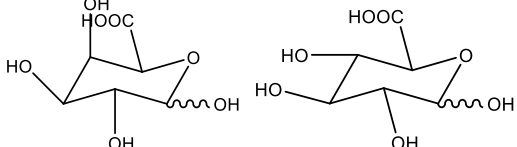
AI.2 : Spectre HSQH du glucose et du laurate de méthyle



AI.3 : Spectre IRTF du milieu réactionnel de la synthèse des esters de mucilage obtenus par agitation ultraturrax

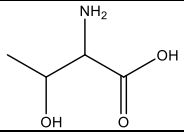
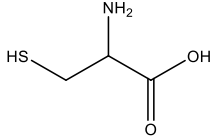
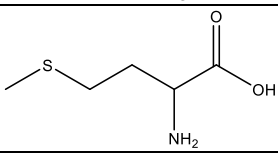
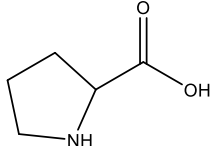


AI.4 : Structure des monosaccharides présents dans le mucilage

Monosaccharides	Structures	Masse molaire
Fucose		164
Arabinose		150
Rhamnose		164
Galactose		180
Glucose		180
Xylose		150
Mannose		180
Fructose		180
Acides uroniques		194

AI.5 : Classification des acides aminés en fonction de la chaîne latérale

Acides aminés	Classification	Structure	
Acide aspartique	Diacides		
Acide glutamique			
Lysine	Dibasiques		
Arginine			
Histidine			
Glycine	Aliphatiques		
Alanine			
Valine			
Isoleucine			
Leucine			
Phénylalanine		Aromatique	
Tyrosine			
Sérine	Hydrophiles hydroxylés		

Thréonine		
Cystéine	Soufrés	
Méthionine		
Proline	Cyclique	

Annexe II : Valorisation des résultats des présents travaux

AII.1 : Communications aux congrès internationaux

- Lipids & Brain IV : lipids in alzheimer disease, Nancy (France), 2017

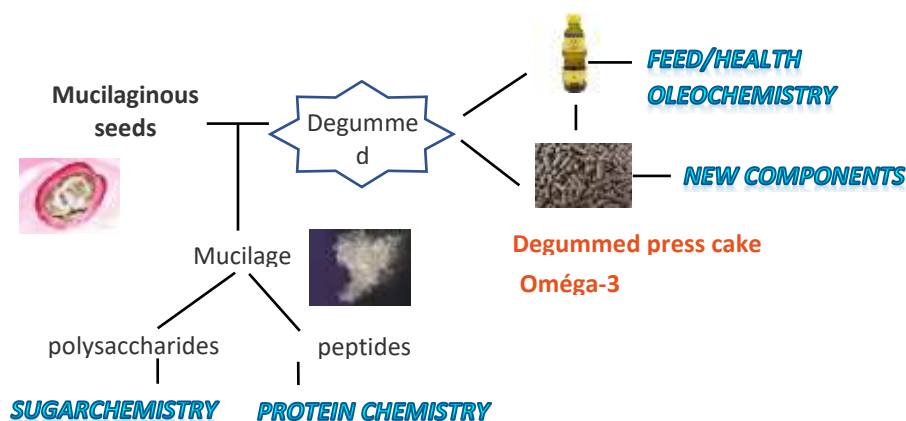
Titre : Chia seeds: a functional food for the prevention of alzheimer's disease

Gwendoline GRAVE, Sidrine KOUMBA, Jean-François FABRE, Eric LACROUX, Romain VALENTIN, Muriel CERNY, Othmane MERAH, Zéphirin MOULOINGUI

Benefits of omega-3 for memory and brain health are a well-known fact. For instance, omega-3 fatty acids shown anti-amyloid, anti-tau and anti-inflammatory actions in animals or humans brains. Omega-3 are present in a lot of food such as : flaxseed oil, fish oil, walnuts, soybeans or also in chia seeds. In fact chia seed, in particular Oruro®, a specie developed by the companie PANAM, contains 65% of omega-3 among fatty acids, against only 35% or 53% for cameline seed or flaxseed for example. Omega-3 rates in chia seed changes during seed growth.

This huge amount of omega-3 makes chia seed very attractive and that is why LCA's laboratory with different companies decided to in-depth study chia seed and these applications. All experimentations are realised on seeds from conventional and organic farming. Extraction of omega fatty acids and transformation of this type of molecule without losing instauration are aims of this project in order to keep all healthy interests during the extraction process. The first step of our work is the extraction of mucilage. Carbohydrates are removed by different process such as: mechanical and magnetic agitation or sonication. The second step concerns fatty acids contained in chia oil and their transformation in monoglycerides and/or diglycerides with omega-3 chain. Chia's peptides are also molecules of interest for pharmaceutical applications. The triptych: mucilage, oil and peptides, is a great asset, for instance, for formulation of oil delivery system in the body.

Oleaginous trio with mucilage for conventional and organic seed



- **AOCS Annual Meeting & Expo, Minneapolis (USA), 2018**

Titre : Synthesis of fatty esters from chia seeds mucilage and saturated fatty acids of *Irvingia gabonensis* kernels

Sidrine KOUMBA, Gwendoline GRAVE, Jean-François FABRE, Eric LACROUX, Muriel CERNY, Romain VALENTIN, Raphaël BIKANGA, Zéphirin MOULOUNGUI

Chia seeds (*Salvia hispanica*) and *Irvingia gabonensis* (IG) kernels, offer a wide range of food, pharmaceutical and industrial applications thanks to their specific chemical composition. For instance, the mucilaginous chia seed is rich in polysaccharides, polyunsaturated fatty acids and proteins and the kernel of mango has a high content of saturated fatty acids (SFA).

The aim of this work is to valorize carbohydrates of chia seed mucilage (CSM) and SFA from IG by esterification leading to fatty esters.

CSM is extracted by ultrasonic cavitation in water [1] and characterized. CSM contains approximately 81% of polysaccharides, 6% of proteins and 9% of minerals.

The oil content of IG determined by soxhlet extraction is $63.78 \pm 0.19\%$. SFA content is $97.60 \pm 0.045\%$ and the fatty acid profile shows that myristic ($51.87 \pm 0.18\%$) and lauric ($38.48 \pm 0.09\%$) acids are the most abundant.

Esterification feasibility of sucrose with SFA [2,3] of IG with an optimized process developed in our laboratory predicts the esterification of carbohydrates from CSM with SFA from IG. Products were characterized by IR and NMR spectroscopy and chromatographic methods.

Sucrochemistry of carbohydrates of CSM by O-acylation with SFA of IG kernel could lead to the synthesis of new compounds that would find applications as emulsifier, texturing, complexing, surfactant properties...

Keywords: Chia, *Irvingia gabonensis*, ultrasounds, hot pressing, carbohydrates esters, emulsifier, surfactant.

1. Fabre, J.-F. et al. Ind. Crops Prod. 65, 354-360 (2015)
2. Lemaire-Claverie V. et al., US Patent No 6,706,877 B1 (2004)
3. Mouloungui, Z. et al. La lipochimie. In La chimie verte, 305-356 (2006).

- **Chimie face aux défis et grands enjeux environnementaux ruraux et urbains, Brazzaville (Congo), 2019**

Titre : Synthèse des esters de sucre à base de mucilage des graines de chia et des acides gras de l'huile d'*Irvingia gabonensis*

Koumba Sidrine, Gravé Gwendoline, Fabre Jean-François, Cerny Muriel, Lacroux Eric, Valentin Romain, Merah Othmane, Raphaël Bikanga, Mouloungui Zéphirin

Les graines de Chia (*Salvia hispanica L.*) et les amandes de la mangue sauvage (*Irvingia gabonensis*) ont une composition chimique offrant plusieurs voies de valorisation pour des applications industrielles, médicales, pharmaceutiques et agricoles.

Originaires d'Amérique centrale, les graines de chia sont une source exceptionnelle d'oméga 3 (63% d'acide alpha-linolénique) mais également de mucilage surfacique riche en polysaccharides (81%), de protéines (6%) et de minéraux (9%). Les amandes d'*Irvingia gabonensis* sont une source importante de triglycérides (97%) riche en acides gras saturés, notamment en acide myristique (51%) et acide laurique (38%).

L'objectif principal de cette étude est de synthétiser de nouveaux tensioactifs par estérification à partir de deux sources naturelles extraites par des processus de chimie durable : le mucilage de graines de chia obtenu par extraction aqueuse par cavitation ultrasonore d'une part et les triglycérides de la mangue sauvage extrait par pressage à chaud d'autre part.

Les processus de transformation des substrats mucilage et triglycérides en esters de mucilage présente plusieurs défis scientifiques notamment l'hétérogénéité des substrats et la complexité du mucilage qui possèdent des fonctions hydroxyles et acides carboxyliques disponibles pour la réaction d'estérification. La synthèse est réalisée par un procédé catalytique micellaire en présence de l'acide 4-dodécylbenzènesulfonique (ADBS) pour faciliter la mise en contact des substrats. Les produits issus de l'estérification du mucilage doivent présenter un faible degré de substitution pour avoir une meilleure réactivité interfaciale.

Mots clés : Chia, *Irvingia gabonensis*, ultrasons, pressage, esters de sucre

AII.2. Participation au concours Jean-Claude Flamant à l'INRA-Toulouse, Edition 2018

La graine de chia (*Salvia hispanica L.*), originaire d'Amérique centrale, fut jadis cultivée par les Mayas qui l'utilisaient comme aliment et médicament. Elle est actuellement consommée en graines directement ou pour son huile. La graine est composée de 15-25% de protéines, 18-30% de fibres dont 26-41% de polysaccharides, 30-33% d'huile dont 20% d'oméga 6 et 68% d'oméga 3, de vitamines, de minéraux d'antioxydants et est sans gluten. Ce qui fait d'elle un aliment aux propriétés nutritionnelles remarquables et valorisables dans le traitement des maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, du diabète... Nous avons pu montrer ces atouts dans un poster au Congrès international *Lipids & Brain IV : Lipids in Alzheimer Disease* d'octobre 2017 à Nancy.

D'où notre question de recherche : cette espèce peut-elle permettre d'intégrer des systèmes alimentaires qui contribueront à la production agricole, l'alimentation, la consommation et la nutrition ? Ce modèle, par la maîtrise de sa culture et domestication peut répondre à trois domaines thématiques prioritaires de l'INRA :

#3Perf : Après 10 ans de sélection, la société Panam (Villemur/Tarn, 31) a créé une variété cultivable en zones tempérées : ORURO®. Marquant le point de départ du projet CHIA-INNOV (Convention Région RECH n°16004168, 2017) soutenu par la Région Occitanie/Pyrénées-Méditerranée, cette variété est la première et la seule cultivée en France. Protégée depuis 2013 et reconnue par l'Union Européenne comme nouvel ingrédient, la variété ORURO® y obtient la notification européenne d'accord de mise sur le marché en mars 2016.

Nos recherches sur la graine de chia ORURO® vise la valorisation des biopolymères lipides, protéines et polysaccharides de cette graine. Un schéma de libération de ces composés a conduit à la démulcination préalable des graines qui seront également utilisées comme semence. Ce projet vise également la bioaccumulation de ces composants dans la graine entière cultivée en conventionnel et en biologique. Les essais seront réalisés à Masseube à la ferme la Mirandette (Compagnie d'Aménagement des Coteaux de Gascogne labellisé par le ministère de l'agriculture). Cette étude permettra de connaître l'évolution de la nature de l'huile et de ses constituants majeurs (acides gras) et mineurs (tocophérols, stérols, etc), des mucilages, des protéines et des minéraux durant la formation et le remplissage des graines. Les graines immatures de chia trouveraient-elles leur place en utilisation directe dans l'alimentation et la nutrition?

Le projet ambitionne de créer, structurer et développer une filière chia entièrement dédiée à la production et la valorisation des graines adaptées à l'agro-raffinerie.

#Food : Le mucilage, localisé à la surface de la graine et constitué de protéines, polysaccharides et minéraux, représente environ 6% de son poids. Mon travail consiste premièrement à extraire ce mucilage par voie humide, par les effets de cavitation ultrasonore, et à le caractériser afin d'ouvrir de nouvelles voies de valorisation. Nous avons étudié le comportement rhéologique et déterminé les teneurs en protéines, polysaccharides et minéraux du mucilage ainsi que les compositions en acides aminés et monosaccharides par des méthodes chromatographiques. Les derniers travaux montrent que les mucilages ont un comportement rhéologique proche de celui

d'un fluide élastique. Ces polysaccharides capables de retenir jusqu'à 27 fois leur poids en eau confèrent au mucilage des propriétés gélifiantes et épaississantes valorisables dans des formulations alimentaires, cosmétiques et industrielles. Ils peuvent être consommés comme compléments alimentaires et, en tant que source de fibres solubles. Ils agissent sur le système digestif et la régulation de la glycémie.

#Biores : Dans la deuxième partie de ma thèse, nous visons le développement de nouveaux composés technofonctionnels à partir du mucilage de la graine de chia. Pour cela, nous prévoyons l'hydrolyse enzymatique et/ou chimique préalable du mucilage pour libérer les oligosaccharides des oligopeptides recherchés en agriculture. Ensuite, nous envisageons d'étudier l'oxydation enzymatique des polysaccharides du mucilage de chia pour favoriser davantage des groupes carboxyliques ionisables. Ces polysaccharides oxydés trouveraient des applications en tant qu'épaississants, stabilisateurs, hydrogels, complexants biosourcés utilisables dans l'agriculture, superabsorbants, agents séquestrants pour remplacer les séquestrants actuels controversés par de nouveaux plus éco-compatibles dans des formulations spécifiques en détergence, pharmacie, cosmétique, parfumerie, etc.



Atypical Reaction Media and Organized Systems for the Synthesis of Low-Substitution Sugar Esters

Sidrine Kerthy Koumba Ibings^{1,2}, Jean-François Fabre¹, Raphaël Bikanga² and Zéphirin Mouloungui^{1*}

¹Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, Université de Toulouse, INRA, Toulouse, France, ²Laboratoire des Substances Naturelles et de Synthèse Organo-Métallique, LASNSOM, Université des Sciences et Techniques de Masuku, Franceville, Gabon

OPEN ACCESS

Edited by:

Svetlana Ivanova,
University of Seville, Spain

Reviewed by:

Benoit Louis,
UMR7515 Institut de Chimie et
Procédés pour l'Énergie,
l'Environnement et la Santé
(ICPEES), France
Antonio Morzon,
University of Zaragoza, Spain

*Correspondence:

Zéphirin Mouloungui
zephirin.mouloungui@ensiacet.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Green and Sustainable Chemistry,
a section of the journal
Frontiers in Chemistry

Received: 13 June 2019

Accepted: 06 August 2019

Published: 23 September 2019

Citation:

Koumba Ibings SK, Fabre J-F,
Bikanga R and Mouloungui Z (2019)
Atypical Reaction Media and
Organized Systems for the Synthesis
of Low-Substitution Sugar Esters.
Front. Chem. 7:587.
doi: 10.3389/fchem.2019.00587

Sugar esters are non-ionic surfactants with amphiphilic properties of interest for the formulation of various products in the fields of detergents, foods, medicines, pharmaceuticals, agriculture, and cosmetics. The properties of sugar esters depend on their degree of substitution (we consider degrees of substitution between 1 and 3 here) which guides their use. Sugar esters are biodegradable and non-toxic, and the demand for these compounds is high and continuing to increase. Indeed, interest in these compounds stems from the natural origin of the raw materials, the synthetic processes involved and the performance of the final product. The choice of reaction medium is crucial, to facilitate contact between reactants and prevent hydrolysis of the products. In this review, we provide an overview of the processes and synthesis routes for sugar ester production, ionic liquids and deep eutectic solvent as non-usual media or with organized systems.

Keywords: sugars, organized media, sugar fatty acid esters, degree of substitution, ionic liquids, deep eutectic solvent, emulsion

INTRODUCTION

Sugars are renewable resources ideal for the development of chemical synthesis of new biocompatible and biodegradable sugar-based surfactants (Silvestre et al., 2010). Sugar fatty acid esters (SFAEs) are amphiphilic molecules with properties dependent on their degree of substitution (DS). DS is defined as the number of esterified hydroxyl groups. Previous reviews have reported the synthesis pathways, properties and potential applications of these compounds in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries (Akoh, 2002; Zheng et al., 2015). Synthesis focuses on esters with a DS of 1–3 which have a number of interesting properties: hydrophilic-lipophilic balance (HLB), critical micelle concentration (CMC), surface tension, emulsifying stability (especially O/W and some W/O emulsions, multiple emulsions), foaming ability (Liang et al., 2018; Ma et al., 2018), biological activities, and thermal properties. Sucrose esters (SEs) are the most widely used; those with a DS of 1–4 are hydrophilic, whereas those with a DS of 5–8 are lipophilic. Sucrose esters with a low DS have an HLB value of about 5–16 and are most suitable for use in O/W emulsions. Hydrophilic sucrose esters are digestible and absorbable (DS 1–3), antimicrobial (DS 1–2), and can be used as emulsifiers, wetting or dispersion agents, solubilization, stabilization, and antimicrobial agents (Szuts and Szabó-Révész, 2012; Zheng et al., 2015).

The HLB, CMC, and surface tensions of the sucrose esters are reported (Soultani et al., 2003; Zhang et al., 2014; Zheng et al., 2015). SFAEs are odorless, non-toxic, biodegradable do not irritate the skin (Ferrer et al., 1999; Madsen et al., 2001; Plat and Linhardt, 2001). Some SFAEs have been shown to have insecticidal, antibacterial, and antitumor activities (Okabe et al., 1999; Watanabe et al., 2000; Puterka et al., 2003; Ferrer et al., 2005; Zhang et al., 2015; AlFindee et al., 2018). These compounds are stable at temperatures of up to 120–130°C, with total decomposition generally occurring at 260°C.

SFAEs are synthesized by esterification or transesterification from carbohydrates and fat in the presence of a chemical or enzymatic catalyst. The synthesis of these compounds is subject to several difficulties, such as low reactivity due to the immiscibility of the raw materials, regioselectivity and control over the DS which may orient and condition the synthesis of the desired products and their properties. SFAEs have long been obtained in organic solvents, such as dimethylsulfoxide, dimethylformamide and pyridine, in which both sugars and fats are soluble (Piccicuto et al., 2001). However, these organic solvents are toxic, non-volatile, and incompatible with food applications. In this mini-review, we present three original experimental approaches for overcoming these problems. The first two approaches involve the synthesis of SFAEs with atypical solvents, such as ionic liquids (ILs) and deep eutectic solvents (DESS). ILs and DESS have been described as potential solvents for several reactions in the last 20 years (Yang and Huang, 2012; Nowicki and Muszynski, 2014; Megias-Sayago et al., 2016; Vanda et al., 2018). The third approach involves iterative micellization to drive the molecular organization of the particles and their reactivity (Claverie et al., 2004; Zhao et al., 2014).

IONIC LIQUIDS FOR THE SYNTHESIS OF SFAEs

ILs and DESS have emerged as attractive green alternatives to organic solvents. Interest in these solvents has increased since 1985 (Seddon, 1997; Zhang et al., 2012; Paiva et al., 2014; Smith et al., 2014; Husson et al., 2018; Vanda et al., 2018) (**Supplementary Materials**). ILs are organic salts that melt below 100°C and are liquid at room temperature. They are often referred to as “designer solvents” because they are obtained by combining anions and cations. They are non-volatile and have good chemical and thermal stabilities. They can be used to dissolve polar, non-polar, inorganic, and polymeric organic compounds (Yang and Pan, 2005).

ILs have been used in SFAEs synthesis, to replace conventional solvents and overcome the problems of sugar solubility and the immiscibility of sugar and fat. The choice of ILs as solvents for the synthesis of SFAEs is based on their ability to dissolve carbohydrates (Liu et al., 2005; Zhao et al., 2008; Yang and Huang, 2012), which appears to be strongly related to the nature of the anion and the cation (Galonde et al., 2013). ILs containing the dicyanamide anion ([dca]) can dissolve up to 145 g/L glucose and

220 g/L sucrose at room temperature (Forsyth and MacFarlane, 2003; Liu et al., 2005) and have a low viscosity (MacFarlane et al., 2001). Reactions may be performed in the presence or absence of enzymes (Abdulmalek et al., 2012; Yang and Huang, 2012; Findrik et al., 2016). In chemical synthesis, ILs can act as both the catalyst and the solvent of the reaction (Forsyth et al., 2002; Lin et al., 2016). The choice of IL for enzymatic reactions is crucial, to ensure that the enzyme is not deactivated. Enzyme activity in ILs is limited by the viscosity of the medium, but this problem can be overcome by ultrasound irradiation (Lee et al., 2008).

Ganske et al. obtained glucose monoesters by using fatty acids and the corresponding vinyl esters as acyl donors in the presence of the *Candida antarctica* lipase B (CAL-B) immobilized on poly(ethylene glycol). No ester formation was observed with fatty acids in pure ILs, whereas, with vinyl esters, the rate conversion to esters was 30–35%. However, when reactions were performed with a mixture of IL and 40% *ter*-butanol, esters formed with both fatty acids (conversion rate of 64%) and vinyl esters (conversion rate of 90%), with monoester yields of 48 and 89%, respectively (Ganske and Bornscheuer, 2005). Findrik et al. showed that it was possible to react fatty acids with glucose in the same pure IL with a high conversion rate (Findrik et al., 2016). Liang et al. performed an enzymatic synthesis of glucose monopalmitate with 1-butyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate ([Bmim][TfO₃S]) as the IL. Glucose was reacted with palmitic acid vinyl ester in the presence of CAL-B lipase as the catalyst. [Bmim][TfO₃S] dissolved more glucose when the enzyme was activated, and the solubility of glucose in ILs increased with temperature (Liang et al., 2012).

Mai et al. reported a preparative method for generating glucose monolaurate in a mixture of two ILs: 1-butyl-3-methylimidazolium trifluorosulfonate ([Bmim][TfO₃S]) and 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethyl)sulfonylimide ([Bmim][Tf₂N]). They used a supersaturated glucose solution (12g/L), with vinyl laurate as the acyl donor and *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) immobilized on macroporous polyacrylate resin as the catalyst. Under optimal reaction conditions, they obtained a conversion yield of 96%. They also showed that the IL and enzyme could be recycled and reused for up to 10 cycles (Mai et al., 2014). Liu et al. synthesized sucrose dodecanoate with an immobilized lipase (Novozym 435) and an activated molecular sieve mixed with [BMIm][dca] (Liu et al., 2005).

Lin et al. described the synthesis of glucose monolaurate in ILs (Lin et al., 2015, 2016) with and without the use of enzymes. They studied the impact of the IL on SFAEs synthesis by enzymatic processes and they showed that better ester formation was achieved with ILs with a hydrophobic cation and a hydrophilic anion, such as [HMIm][TfO]. Tetraalkylammonium acetate was used as the solvent and chemical catalyst in enzyme-free reaction. A two-solvent system based on Tetrabutylammonium acetate ([Bu₄N][Ac]) and 2-methyl-butanol allows a high glucose solubility (13 mM in 2-methyl-butanol vs. 173 mM in [Bu₄N][Ac]) and a lower viscosity of the medium. The products obtained in the presence and absence of enzyme had similar retention times on HPLC, suggesting that specificity was retained. The regioselective reaction takes place in mild conditions and

Abbreviations: DS, degree of substitution; DES, deep eutectic solvent; ILs, ionic liquids; SFA, sucrose esters; SFAEs, sugar fatty acid esters.

there is no need to eliminate water during the reaction. However, the products obtained in the presence of ILs were difficult to recover. A synthesis mechanism has been proposed for this reaction: in the presence of water, tetraalkylammonium ions (tetrabutyl, tetraethyl and tetramethyl) and acetates are dissolved. The acetates attack the oxygen in position 6 of glucose by nucleophilic substitution. The non-binding glucose doublet then attacks the carbonyl group of vinyl laurate and a tetrahedral intermediate is formed. This intermediate breaks down into glucose ester due to the provision of the leaving group, vinylate, by the activated acyl donor, the vinyl ester.

This work showed that it was possible to obtain SFAEs with a low DS from reactions in which ILs were used not only as the solvent, but also as a catalyst, in the presence or absence of an enzyme. In 2015, Zheng et al. wrote a book chapter about the synthesis of SFAEs, their physicochemical properties and their potential uses. They described chemical and enzymatic synthesis of sugar esters in organic solvents and ILs (Zheng et al., 2015). In the same year, the first synthesis of SFAEs with DES as the solvent was reported. In this review, we also consider the synthesis of sugar esters with DES as the solvent and in solvent-free emulsification processes.

SYNTHESIS OF SFAEs IN THE PRESENCE OF DES

DESs are a new type of green solvent obtained by mixing two or more compounds to obtain a substance with a melting point lower than the melting points of each of the individual compounds. When the compounds used to prepare the DES are primary metabolites, such as amino acids, organic acids, sugars or choline derivatives, the resulting DESs are called Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) (Dai et al., 2013). DESs and NADES can find applications in catalysis, organic synthesis, biotechnology and bioengineering, electrochemistry (Zhang et al., 2012; Smith et al., 2014; Mbous et al., 2017). DESs are prepared by complexing a quaternary ammonium salt, such as choline chloride, with a hydrogen bond donor, such as amine, alcohol, amide or carboxylic acid. DESs differ from ILs in the source of the raw materials and the chemical processes used for their preparation. DESs are easier to prepare and are obtained from readily available cheaper compounds. They are also considered to be more biodegradable, biocompatible and sustainable compounds than ILs. They may therefore be considered a useful alternative to ILs.

One of the most frequently encountered problems with the use of DESs as solvents is the high viscosity of the medium. Studies of the thermophysical properties of DESs (density, viscosity, polarity, conductivity) is an important area of investigation for the adaptation of DES preparations for the desired applications (Craveiro et al., 2016). Hayyan et al. studied the physical properties of a DES consisting of choline chloride (ChCl) and glucose (Glc). They found that, for ChCl:Glc ratios of 1:1, 1.5:1, 2:1, 2.5:1 by weight, the DES obtained was colorless liquid at room temperature. In the other conditions tested (ChCl:Glc ratios of 1:1.5, 1:2 and 1:2.5), the mixture was semi-solid. Viscosity and surface tension were lowest for a ratio of 2:1

by weight at 85°C. This study showed that DESs prepared from choline and glucose generally had a high viscosity, density and surface tension at room temperature (Hayyan et al., 2013). Zhao et al. reported the synthesis of SFAEs in a two-solvent mixture of DES and 2-methyl-2-butanol in the presence of lipozyme TLIM (*Thermomyces lanuginose* lipase) as the catalyst. They obtained glucose monoester yields of <15%, probably due to the properties of the solvent (Zhao et al., 2016).

Pöhnlein et al. studied the enzymatic synthesis of glucose hexanoate in various DESs (Pöhnlein et al., 2015). The DESs were prepared by mixing ammonium salts and the hydrogen donor in various proportions at 100°C until a liquid mixture was obtained. The various reagents (glucose: 1.38 mmol and vinyl hexanoate: 2.72 mmol) were dissolved in 3.5 mL DES. The enzyme was then added and the reaction mixture was incubated for three days at 70°C. DES has the advantage of being a good solvent for both substrates. As the DES acts as both substrate and solvent, the addition of more sugar is unnecessary. Glucose 6-O-hexanoate with a DS of 1 was obtained as the product.

SYNTHESIS OF SFAEs IN ORGANIZED MEDIA

Acyl transfer reactions have also been performed in an organized system, using a surfactant for the synthesis of sugar fatty acid esters. The micellization steps for the synthesis of the SFAEs have been studied, to increase the contact area between the reagents.

Claverie et al. described a process for the synthesis of sucrose esters with a low DS using sucrose, palm oil methyl ester (POME), a basic catalyst and another sucrose ester (with a DS 1–3) as a non-ionic surfactant. This synthesis was performed in two main steps. In the first step, the reagents were premixed to prepare the organized medium (catalyst: K_2CO_3 (5% by wt), 80–100°C for 15–30 min). The key parameters for this step are the shearing of the medium, the temperature and the composition of the mixture. For this step, a pseudo-ternary-phase diagram of water/POME/sucrose esters was produced, under conditions of mechanical agitation, and the different phases were analyzed under a polarizing microscope. Four zones were identified on the diagram: fluid milky O/W emulsions, consistent and fluid O/W emulsions, W/O emulsions and oily and isotropic emulsions with droplets of more than 100 μm in diameter (Figure 1). The emulsions were stabilized and contact between the reagents was increased by decreasing the particle size through a change in shearing method and by studying the impact of the catalyst. Agitation with a rotor/stator stirrer greatly decreased particle size and, in the presence of micronized K_2CO_3 , the aggregates were 30 μm in diameter, regardless of the zone (Table 1). This study showed that a stable milky, fluid O/W emulsion promotes the reaction. It also revealed that preferential dispersion of the micronized K_2CO_3 catalyst in the fatty phase made a major contribution to reactivity due to the irreversible adsorption of this substrate. Under high-pressure homogenization (400 bars), aggregates of 1 μm in diameter were obtained.

The sucrose esters were then formed. The premix was loaded into a reactor and transesterification was allowed to occur at 120–140°C, 2–8 mbar for 4 h. During this process, the

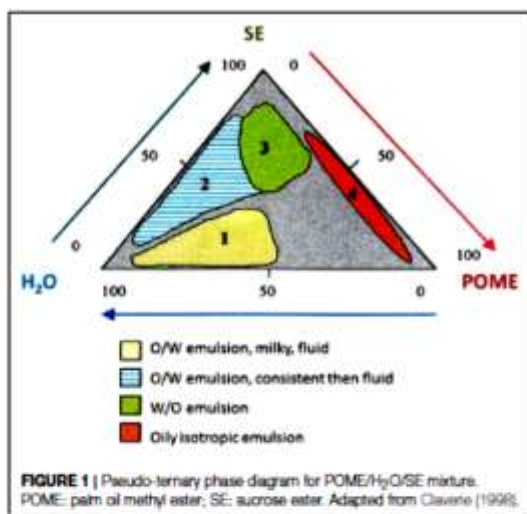


TABLE 1 | Size of the droplets of sucrose ester emulsions.

Zone	Mechanical agitation 1,000 t/min	Rotor/stator 3,000 t/min	K ₂ CO ₃ + Rotor/stator 3,000 t/min
1	> 100 μm	15 μm	30 μm
2	> 100 μm	5–10 μm	30 μm
3	> 100 μm	30 μm	30 μm
4	> 100 μm	30 μm	30 μm

transesterification reaction of acyl transfer was coupled with the continuous elimination of methanol. The proposed mechanism of sucrose esters synthesis is as follows: in the first step, the reagents are adsorbed onto the surface of the catalyst, where the reaction takes place. The carbonyl group is activated by the delocalization of its π electrons (Mouloungui et al., 1989). The reaction is therefore favored at the surface, and then at the interface, where the hydroxyl group of a sucrose molecule can react easily. The presence of sucrose esters during this emulsion/dispersion step helps to stabilize the medium. The next step was the desorption of the reaction products. This study revealed that the reaction involves the generation of an intermediate with a DS of 6, with acyl transfer from this intermediate to sugar. Monoesters (15%), diesters (25%) triesters and higher order esters (60%) with a DS of between 1 and 2 were obtained (Clavier et al., 2004).

Zhao et al. synthesized sucrose esters under anhydrous conditions by basic heterogeneous catalysis in the presence of methyl esters as acyl donors. They studied the solubility of sucrose in methyl esters with and without the addition of fatty acid salts or sucrose esters as surfactants. They found that the use of these compounds increased sucrose solubility and resulted in the generation of emulsion. The mechanism of sucrose esters synthesis consisted of three main steps. First, 0.112 moles of

sucrose and 0.335 moles of methyl stearate were mixed in a vacuum system at 40°C, dehydrated and deacidified with calcium oxide. The temperature was increased to 120°C and a mechanical mixer operating at 1,000 rpm was used to mix the reagents. The sugar and ester were then adsorbed onto the surface of the sodium hydroxide used as a catalyst (previously dried), leading to the formation of a sucrose monoester. The sucrose ester formed was desorbed. The sucrose ester can facilitate sugar dissolution and undergo additional adsorption and desorption steps to generate polyester. An analysis of the products by high-performance liquid chromatography revealed the presence of mono-, di- and tri-esters (Zhao et al., 2014).

The performance of reactions in emulsions makes it possible to develop organized molecular systems. The use of emulsions also facilitates the control over the DS. Indeed, the studies described above have shown that the mode of shearing affects the process of emulsion formation and can be modulated to obtain small droplets and increase contact between reagents. Sugar esters produced in emulsions are suitable for use in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries.

CONCLUSIONS

The synthesis of sugar fatty acid esters has been the focus of considerable research efforts. Biosourced products are at the heart of major economic and industrial challenges, and, with the development of environmental regulatory constraints, the production and consumption of biosourced products have recently increased in response to strong consumer demand. This trend is opening up new opportunities for the development of plant chemistry. This review focuses on efficient and clean methods for synthesizing sugar fatty acid esters. Sugar fatty acid esters can be synthesized with ionic liquids and deep eutectic solvents as solvents and/or catalysts, or by an emulsification process. ILs and DESs are promising solvents for the synthesis of SFAEs because they can be used to dissolve a wide range of compounds of different polarities. However, the use of ILs as solvents remains controversial, due to the reagents used and their method of preparation, together with uncertainties about their biodegradability. DESs are genuine green alternative solvents to organic solvents and ILs, as they are obtained from natural and renewable raw materials. Their properties could be improved because they are potentially limiting for use in the synthesis of sugar esters. For the emulsification process, control over the emulsification steps (dispersion by appropriate techniques) has proved essential for efficient acyl transfer reactions and withdrawal of the co-product. Sugar esters with a low degree of substitution can be obtained if the reactions conditions are controlled appropriately.

The use of a DES organized medium for the synthesis of SFAEs could effectively comply with the principles of green chemistry. Indeed, the syntheses are based on non-toxic methods with no deleterious consequences to the environment thanks to the use of renewable raw materials, safe solvents, catalytic and non-stoichiometric reagents. The use of DESs constitutes a real improvement in terms not only of energy conservation, but also in terms of atom sparing and the generation of a smaller chemical footprint.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Agence Nationale des Bourses du Gabon (No. 2016.101326 /PR/ANBG/CT) and Campus France for the

Ph.D. grant of KISK. The authors also acknowledge the financial assistance of the Union Européenne and Région Occitanie through the Chia-Innov project (Convention Région RECH n°16004168).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2019.00587/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abdulmalek, E., Mohd Saufi, H. S., Tejo, B. A., Basri, M., Salleh, A. B., Raja Abd Rahman, R. N. Z., et al. (2012). Improved enzymatic galactose oleate ester synthesis in ionic liquids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 76, 37–43. doi: 10.1016/j.molcatb.2011.12.004
- Akoh, C. C. (2002). "Lipid-based synthetic fat substitutes," in *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, eds C. C. Akoh, and D. B. Min (New York, NY: CRC Press), 695–727.
- Al'fandee, M. N., Zhang, Q., Subedi, Y. P., Shrestha, J. P., Kawasaki, Y., Grilley, M., et al. (2018). One-step synthesis of carbohydrate esters as antibacterial and antifungal agents. *Bioorg. Med. Chem.* 26, 765–774. doi: 10.1016/j.bmc.2017.12.038
- Claverie, V. (1998). *Mise au point d'un nouveau procédé de synthèse des esters de saccharose de degré de substitution contrôlé par une réaction de transfert d'acycle en milieu hétérogène solide/liquide*. (Master's thesis). Université de Toulouse, Toulouse, France.
- Claverie, V., Cecutti, C., Mouloungui, Z., Gaset, A., and Ferrebach, C. I. H. (2004). *Method for Producing Carbohydrate Partial Esters*. Düsseldorf, DE: U.S. Patent and Trademark Office No. 09402761.
- Craveiro, R., Aroso, I., Flammia, V., Carvalho, T., Viciosa, M. T., Dionisio, M., et al. (2016). Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *J. Mol. Liq.* 215, 534–540. doi: 10.1016/j.molliq.2016.01.038
- Dai, Y., van Spronsen, J., Wilkamp, G. J., Verpoorte, R., and Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta* 766, 61–68. doi: 10.1016/j.aca.2012.12.019
- Ferrer, M., Cruces, M. A., Bernabé, M., Ballesteros, A., and Plou, F. J. (1999). Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 65, 10–16. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19991005)65:1<10::AID-BIT2>3.0.CO;2-L
- Ferrer, M., Soliveri, J., Plou, F. J., López-Cortés, N., Reyes-Duarte, D., Christensen, M., et al. (2005). Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 391–398. doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.02.009
- Findrik, Z., Megyeri, G., Gubicza, L., Bélafi-Bakó, K., Nemestóthy, N., and Sudar, M. (2016). Lipase catalyzed synthesis of glucose palmitate in ionic liquid. *J. Clean. Prod.* 112, 1106–1111. doi: 10.1016/j.jclepro.2015.07.098
- Forsyth, S. A., and MacFarlane, D. R. (2003). 1-Alkyl-3-methylbenzotriazolium salts: ionic solvents and electrolytes. *J. Mater. Chem.* 13, 2451–2456. doi: 10.1039/B307931G
- Forsyth, S. A., MacFarlane, D. R., Thomson, R. J., and von Itzstein, M. (2002). Rapid, clean, and mild O-acetylation of alcohols and carbohydrates in an ionic liquid. *Chem. Commun.* 7, 714–715. doi: 10.1039/B200306F
- Galonde, N., Nott, K., Richard, G., Debuigne, A., Nicks, F., Fauconnier, C. J., et al. (2013). Study of the influence of pure ionic liquids on the lipase-catalyzed (trans)esterification of mannose based on their anion and cation nature. *Curr. Org. Chem.* 17, 763–770. doi: 10.2174/1385272811317070010
- Ganike, F., and Bornscheuer, U. T. (2005). Lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in ionic liquids. *Org. Lett.* 7, 3097–3098. doi: 10.1021/ol0511169
- Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Wahaibi, T., and Hashim, M. A. (2013). Glucose-based deep eutectic solvents: physical properties. *J. Mol. Liq.* 178, 137–141. doi: 10.1016/j.molliq.2012.11.025
- Huason, E., Auxenfans, T., Herbaut, M., Baralle, M., Lambertyn, V., Rakotoarivonina, H., et al. (2018). Sequential and simultaneous strategies for biorefining of wheat straw using room temperature ionic liquids, xylanases and cellulases. *Bioresour. Technol.* 251, 280–287. doi: 10.1016/j.biortech.2017.12.047
- Lee, S. H., Nguyen, H. M., Koo, Y. M., and Ha, S. H. (2008). Ultrasound-enhanced lipase activity in the synthesis of sugar ester using ionic liquids. *Process Biochem.* 43, 1009–1012. doi: 10.1016/j.procbio.2008.05.001
- Liang, J., Zeng, W., Yao, P., and Wei, Y. (2012). Lipase-catalyzed regioselective synthesis of palmitoylglucose ester in ionic liquids. *Adv. Biol. Chem.* 2, 226–232. doi: 10.4236/abc.2012.23027
- Liang, M. Y., Chen, Y., Banwell, M. G., Wang, Y., and Lan, P. (2018). Enzymatic preparation of a homologous series of long-chain 6-O-acylglucose esters and their evaluation as emulsifiers. *J. Agric. Food Chem.* 66, 3949–3956. doi: 10.1021/acs.jafc.8b00913
- Lin, X. S., Wen, Q., Huang, Z. L., Cai, Y. Z., Halling, P. J., and Yang, Z. (2015). Impacts of ionic liquids on enzymatic synthesis of glucose laurate and optimization with superior productivity by response surface methodology. *Process Biochem.* 50, 1852–1858. doi: 10.1016/j.procbio.2015.07.019
- Lin, X. S., Zou, Y., Zhao, X. H., Yang, T. X., Halling, P., and Yang, Z. (2016). Tetraalkylammonium ionic liquids as dual solvents-catalysts for direct synthesis of sugar fatty acid esters. *J. Surfactants Deterg.* 19, 511–517. doi: 10.1007/s11743-016-1798-7
- Liu, Q., Janssen, M. H. A., van Rantwijk, F., and Sheldon, R. A. (2005). Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations. *Green Chem.* 7, 39–42. doi: 10.1039/B412848F
- Ma, Y. R., Banwell, M. G., Yan, R., and Lan, P. (2018). Comparative study of the emulsifying properties of a homologous series of long-chain 6'-O-acylmaltose esters. *J. Agric. Food Chem.* 66, 8832–8840. doi: 10.1021/acs.jafc.8b02391
- MacFarlane, D. R., Golding, J., Forsyth, S., Forsyth, M., and Deacon, G. B. (2001). Low viscosity ionic liquids based on organic salts of the dicyanamide anion. *Chem. Commun.* 16, 1430–1431. doi: 10.1039/B105064G
- Madsen, T., Boyd, H. B., Nylén, D., Pedersen, A. R., Petersen, G. I., and Simonsen, F. (2001). *Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic Detergent Products*. Environmental Project.
- Mai, N. L., Ahn, K., Bae, S. W., Shin, D. W., Morya, Y. K., and Koo, Y. M. (2014). Ionic liquids as novel solvents for the synthesis of sugar fatty acid ester. *Biotechnol. J.* 9, 1565–1572. doi: 10.1002/biot.201400099
- Mbouss, Y. P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A., and Luo, C. Y. (2017). Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—promises and challenges. *Biotechnol. Adv.* 35, 105–134. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.006
- Megias-Sayago, C., Carrasco, C. J., Ivanova, S., Montilla, F. J., Galindo, A., and Odrionola, J. A. (2016). Influence of the ionic liquid presence on the selective oxidation of glucose over molybdenum based catalysts. *Catalysis Today* 278, 82–90. doi: 10.1016/j.cattod.2016.06.040
- Mouloungui, Z., Delmas, M., and Gaset, A. (1989). The Wittig-Horner reaction in weakly hydrated solid/liquid media: structure and reactivity of carbanionic species formed from ethyl (diethyl phosphono)acetate by adsorption on solid inorganic bases. *J. Org. Chem.* 54, 3936–3941. doi: 10.1021/jo00277a035
- Nowicki, J., and Muszynski, M. (2014). Ionic liquids as catalysts and reaction media in oleochemical raw materials processing: a review. *Curr. Org. Chem.* 18, 2797–2807. doi: 10.2174/1385272819666140630170909

- Okabe, S., Suganuma, M., Tada, Y., Ochiai, Y., Suesoka, E., Kohya, H., et al. (1999). Disaccharide esters screened for inhibition of tumor necrosis factor- α release are new anti-cancer agents. *Int. J. Cancer Res. Genet* 90, 669–676. doi: 10.1111/j.1349-7006.1999.tb00799.x
- Paiva, A., Cravinho, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., and Duarte, A. R. C. (2014). Natural deep eutectic solvents – solvents for the 21st century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2, 1063–1071. doi: 10.1021/ac500096g
- Piccicuto, S., Blecker, C., Derouanne, C., Brohee, J. C., Mhampara, A., Lognay, G., et al. (2001). Les esters de sucres : voies de synthèse et potentialités d'utilisation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5, 209–219. Available online at: <http://popups.uliège.be/443/1780-4507/index.php?id=14750>
- Plat, T., and Linhardt, R. J. (2001). Syntheses and applications of sucrose-based esters. *J. Surfactants Deterg.* 4, 415–421. doi: 10.1007/s11743-001-0196-y
- Pöhnlein, M., Ulrich, J., Kirschhöfer, F., Nasser, M., Muhle-Göll, C., Kannengieser, B., et al. (2015). Lipase-catalyzed synthesis of glucose-6-O-hexanoate in deep eutectic solvents. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 161–166. doi: 10.1002/ejlt.201400459
- Puterka, G. J., Farone, W., Palmer, T., and Barrington, A. (2003). Structure-function relationships affecting the insecticidal and miticidal activity of sugar esters. *J. Econ. Entomol.* 96, 636–644. doi: 10.1603/0022-0493-96.3.636
- Seddon, K. R. (1997). Ionic liquids for clean technology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 68, 351–356. doi: 10.1002/(SICI)1097-4660(199704)68:4<351::AID-JCTB613>3.0.CO;2-4
- Silvestre, F., Aubey, J. M., Benveniste, T., Breville, J., Durand, M., Lavergne, A., et al. (2010). Agro-resources for a sustainable chemistry. *Actual. Chim.* 28–40. Available online at: http://www.lactualchimique.org/spp.php?numero_article1474
- Smith, E. L., Abbott, A. P., and Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESs) and their applications. *Chem. Rev.* 114, 11060–11082. doi: 10.1021/cr300162p
- Soultani, S., Ognier, S., Engasser, J. M., and Ghoul, M. (2003). Comparative study of some surface active properties of fructose esters and commercial sucrose esters. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 227, 35–44. doi: 10.1016/S0927-7757(03)00360-1
- Stuts, A., and Stabó-Révész, P. (2012). Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems—a mini-review. *Int. J. Pharm.* 433, 1–9. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.076
- Vanda, H., Dai, Y., Wilson, E. G., Verpoorte, R., and Choi, Y. H. (2018). Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *C. R. Chimie* 21, 628–638. doi: 10.1016/j.crci.2018.04.002
- Watanabe, T., Katayama, S., Matsuhara, M., Honda, Y., and Kuwahara, M. (2000). Antibacterial carbohydrate monoesters suppressing cell growth of *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose. *Curr. Microbiol.* 41, 210–213. doi: 10.1007/s002840010121
- Yang, Z., and Huang, Z. L. (2012). Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in ionic liquids. *Catal. Sci. Technol.* 2, 1767–1775. doi: 10.1039/C2CY20109G
- Yang, X., and Pan, W. (2005). Ionic liquids: green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 19–28. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.02.014
- Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., and Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* 41, 7108–7146. doi: 10.1039/C2CS35178A
- Zhang, X., Song, F., Taxipalati, M., Wei, W., and Feng, F. (2014). Comparative study of surface-active properties and antimicrobial activities of disaccharide monoesters. *PLoS ONE* 9:e114845. doi: 10.1371/journal.pone.0114845
- Zhang, X., Wei, W., Cao, X., and Feng, F. (2015). Characterization of enzymatically prepared sugar medium-chain fatty acid monoesters. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1631–1637. doi: 10.1002/jsfa.6863
- Zhao, H., Baker, G. A., Song, Z., Olubajo, O., Crittle, T., and Peters, D. (2008). Designing enzyme-compatible ionic liquids that can dissolve carbohydrates. *Green Chem.* 10, 696–705. doi: 10.1039/B801489B
- Zhao, K. H., Cai, Y. Z., Lin, X. S., Xiong, J., Halling, P. J., and Yang, Z. (2016). Enzymatic synthesis of glucose-based fatty acid esters in bioisolevent systems containing ionic liquids or deep eutectic solvents. *Molecules* 21:E1294. doi: 10.3390/molecules21101294
- Zhao, R., Chang, Z., Jin, Q., Li, W., Dong, B., and Miao, X. (2014). Heterogeneous base catalytic transesterification synthesis of sucrose ester and parallel reaction control. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49, 854–860. doi: 10.1111/ijfs.12376
- Zheng, Y., Zheng, M., Ma, Z., Xin, B., Guo, R., and Xu, X. (2015). "Sugar fatty acid esters," in *Polar Lipids: Biology, Chemistry, and Technology*, eds M. U. Ahmad and X. Xu (Urbana, IL: AOCS Press), 215–243. doi: 10.1016/B978-1-63067-044-3.50012-1

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Koumba Ibanga, Fabre, Bikanga and Mouloungui. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

GLOSSARY

Degree of substitution (DS): the number of esterified hydroxyl groups on a sugar.

Hydrophilic-lipophilic balance (HLB): it is the balance between contributions (size and strength) of the hydrophilic and lipophilic moieties of a surfactant molecule.

Critical micelle concentration (CMC): it is defined as the concentration of surfactants above which additional surfactants added to the system form micelles). O/W emulsion: oil-in-water

emulsion (oil droplets are dispersed in a continuous water phase). W/O emulsion: water-in-oil emulsion (water droplets are dispersed in a continuous oil phase).

Emulsifying stability: can be defined as the system's ability to resist changes (coalescence, flocculation) over time.

Foaming ability: it is defined as the capacity of the surfactants to form foam irrespective of the special foam properties.

Foam stability: it is determined with the measure of the variations of foam height or volume with time, immediately after foam generation. Foaming ability and foam stability are interrelated.

OCL

© G. Gravé *et al.*, Published by EDP Sciences, 2019
<https://doi.org/10.1051/ocl/2019037>



Available online at:
www.ocl-journal.org

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

Accumulation during fruit development of components of interest in seed of Chia (*Salvia hispanica* L.) cultivar Oruro[©] released in France

Gwendoline Gravé¹, Zéphirin Mouloungui^{1,*}, Frederic Poujaud², Muriel Cerny¹, Caroline Pauthe¹, Ibinga Sidrine Koumba¹, Nikiema Diakaridja¹ and Othmane Merah^{1,3}

¹ Laboratoire de chimie agro-industrielle, LCA, université de Toulouse, INRA, Toulouse, France

² Panam-France Company, Les Grèzes, 544, route de Villebrumier, 3134 Villemur-sur-Tarn, France

³ Université Paul Sabatier, IUT A, département génie biologique, Auch, France

Received 13 May 2019 – Accepted 20 September 2019

Abstract – This study aimed to examine the accumulation of oil, fatty acids, sterols and tocopherols contents and compositions during fruit development on the new cultivar of Chia Oruro (Panam Cie, France) cultivated in France. This cultivar is the first released genotype in Europe and for cultivation in Europe. The experiment was conducted in 2017, in south-western France at the Regional centre for organic agriculture, at Auch (near Toulouse, South-West of France). Four samplings were made at 17, 24, 27 and 35 days after flowering (DAF). These dates of sampling correspond to stages 7–8 (fruit development and maturity) of BBCH scale. Oil content, fatty acid composition and sterols and tocopherols contents and profiles were determined. The highest levels of oil and tocopherols were reached at 27 DAF. In contrast, phytosterols content was highest at 17 DAF (726.2 mg/100 g of oil) and decreased after this date. β -sitosterol was the main sterol in chia seed (63.4 to 89.1% of total sterols, depending of stage of fruit development). γ -tocopherol represented more than 92% of the total tocopherols present in the seed. High levels of polyunsaturated fatty acids (74.4 to 80% of total fatty acids) were observed in our study confirming those already reported in this species. High levels of saturated and monounsaturated fatty acids were reported at earlier stages and decreased gradually during fruit development. Polyunsaturated fatty acids followed an opposite trend. Their level was lowest at 17 DAF (74.4%) and increased gradually to reach their higher level at 35 DAF (80%). These results suggested clearly the interest to harvest and use of seed before entire maturity of the grain.

Keywords: Chia / fatty acids / phytosterols / tocopherols / fruit development / accumulation

Résumé – Cette étude a examiné l'accumulation de l'huile, des acides gras, des stérols et des tocophérols durant le développement du fruit du nouveau cultivar de Chia Oruro (Panam Cie, France) cultivé en France. Ce cultivar est le premier génotype sélectionné en Europe et pour l'Europe. L'expérimentation a été réalisée en 2017, dans le sud-ouest de la France, au Centre régional d'expérimentation en agriculture biologique, à Auch (près de Toulouse, dans le sud-ouest de la France). Quatre prélèvements ont été effectués 17, 24, 27 et 35 jours après la floraison (DAF). Ces dates d'échantillonnage correspondent aux stades 7–8 (développement du fruit et maturité) de l'échelle BBCH. La teneur en huile, la composition en acides gras et les teneurs et profils en stérols et en tocophérols ont été déterminés. Les teneurs les plus élevées d'huile et de tocophérols ont été atteintes à 27 DAF. Au contraire, la teneur en phytostérols était la plus élevée à 17 DAF (726,2 mg/100 g d'huile) et a diminué après cette date. Le β -sitostérol a été le principal stérol contenu dans les graines de chia (63,4 à 89,1% des stérols totaux et en fonction du stade de développement du fruit). Le γ -tocophérol représente plus de 92% du total des tocophérols présents dans la graine. Des teneurs élevées d'acides gras polyinsaturés (74,4 à 80% des acides gras totaux) ont été observées dans notre étude, ce qui confirme celles déjà signalées chez cette espèce. Des teneurs plus élevées d'acides gras saturés et mono-insaturés ont été observées aux stades précoces du développement du fruit et

*Correspondence: zephirin.mouloungui@ensiacet.fr

ont diminué progressivement au cours de la maturation. Les acides gras polyinsaturés ont suivi une tendance opposée. Leur niveau était le plus bas à 17 DAF (74,4 %) et a augmenté progressivement pour atteindre leur niveau supérieur à 35 DAF (80 %). Ces résultats suggèrent clairement l'intérêt de récolter et d'utiliser les graines avant leur maturité complète.

Mots clés : Chia / acides gras / phytostérols / tocophérols / développement du fruit / accumulation

1 Introduction

Chia (*Silvia hispanica* L.), a Lamiaceae species, is an ancient Central American crop (Capitani *et al.*, 2012) recently promoted as a functional food and known as source of omega-3 and omega-6. Chia seeds contain more than 30% of oil (310 g/kg of seeds) and, particularly, a high proportion of unsaturated fatty acids present (PUFA: 82.0% and MUFA 6.9%). Chia oil also contains high levels of tocopherols and sterols (Ciftçi *et al.*, 2012). The proportions of these active compounds in chia seeds depend on several factors. Environmental differences, climatic change, the availability of essential nutrients, genotype, year of cultivation and soil type all play a crucial role in determining seed composition (Ayerza and Coates, 2009). For instance, protein levels decrease with increasing temperature (Ayerza and Coates, 2011). An inverse relationship has also been found between altitude and saturated fatty acid (SFA) levels. At low altitude, the proportion of SFA is higher in areas of higher temperature (Ayerza, 2010). In Argentina, temperature was found to influence greatly the fatty acids composition of chia oil (Ayerza, 1995). Seed coat, growing locations, genotypes were found to influence oil content, fatty acid composition of chia seed (Ayerza, 1995, 2010; Ayerza and Coates, 2009, 2011), which allowed to propose the use of these traits as criteria to determine the commercial origin of seeds of chia (Ayerza and Coates, 2011). Moreover, evolution of the quality of chia during plant growth was studied for its interest as forage in green plant part (Peiretti and Meineri, 2008). During plant development, in South America, from April to May, an increase in ambient temperature triggered a decrease in polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels in vegetative plant parts. In Europe, studies performed from May to September, showed a modification of PUFA according genotypes and location (Grimes *et al.*, 2018). The amount of alpha-linolenic acid (ALA) (ω 3) has been shown to decrease by 23% from early development to the budding stage. This decrease is accompanied by increases in linoleic acid (LA) (ω 6) and lignin levels (Peiretti and Meineri, 2008). No information is available on the variation of fatty acid composition during fruit development of chia. Moreover, all the previous studies were carried out in South America. Few studies have been already performed for Chia cultivation in Europe using some genotypes released in America (Bochicchio *et al.*, 2015; Grimes *et al.*, 2018; Karkanis *et al.*, 2018). These works revealed the possibilities to cultivate, in Europe, some genotypes released in South America. Therefore, the aim of this work is to study the accumulation of oil, fatty acids composition, sterols and tocopherols content and composition during seed filling and maturation of one cultivar of Chia released in France in France.

2 Materials and methods

2.1 Plant material, trial and environmental conditions

Seeds of chia, genotype Oruro®, were provided by PANAM Cie (Villemur, France). The experiment was conducted in 2017, in south-western France at the Regional Centre for Organic Agriculture, at Auch (near Toulouse, south-west France, 43°38'47"N, 0°35'08"E). Field trial was carried out on a deep limestone clay silt soil with high water-holding capacity. The trial was sown at a density of 40 seeds by m² on June 6th, with 0.6 m between rows and at 1 cm of depth. The crops were completely managed under organic and rainfed conditions without any chemical supply. Crushed feathers were applied as an organic N fertiliser at a rate of 60 units ha⁻¹. Weeds were eliminated mechanically. Flowering occurred at end August and maturity took place at the end of September. Four samplings were made at 17 (71–73 BBCH stages), (Hack *et al.*, 1992), 24 (77 and 78 BBCH stages), 27 (80 and 81 BBCH stages) and 35 (83–84 BBCH stages) days after flowering (DAF). Sampling at full maturity was not released.

Table 1 presents rainfall and temperatures during the plant cycle and were compared to the weather data of the last 55 years. This comparison was done in order to explain that climatic conditions prevailed during 2017 were, almost as a "model year" of the last half century. Indeed, amount of rainfall in 2017 was quite similar to those recorded during 55 years in the same area. In contrast, the beginning of the cycle was 0.5 °C warmer than the half century temperature (Tab. 1).

2.2 Extraction and determination of fatty acid and sterol contents and compositions

Fatty acids were determined according to a method based on the oil solubility in cyclohexane and the transformation of fatty acids to their methyl esters (norm ISO 5509: 1990). Whole seeds (1 g) were ground with 10 mL of cyclohexane. After centrifugation at 10000 g during 15 minutes, the organic phase is set aside and two others extractions are realised. Organic phases are met and filtered on anhydrous Na₂SO₄. Filtrate is dried by nitrogen flow. The fatty acid profile of the triglycerides present in the oil was determined after trans-methylation with TMSH (0.2 M trimethylsulfonium hydroxide in methanol) according to AFNOR Method NF EN ISO 12966-3. The fatty acids methyl esters (FAME) obtained by this transesterification reaction were analyzed with a gas chromatograph (Roche *et al.*, 2006) equipped with a CP-select CB column (50 m long, 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness); helium was used as the carrier gas, at a flow rate of 1.2 mL/min; split injector (1:100) and FID were maintained at 250 °C; the initial oven temperature was set at 185 °C for 40 min, increased

Table 1. Mean monthly temperatures and rainfall during the cropping season of 2017 and average of 55 years in Auch (near Toulouse, South West of France).

Month	Rainfall (mm)		Temperature (°C)	
	2017	55 years	2017	55 years
June	65,3	61,1	21,8	18,9
July	35,3	47,1	21,7	21,5
August	57,2	58,3	22,1	21,3
September	52,9	55,9	16,7	18,5
October	60,4	56,8	15	14,4
November	17,6	57,2	7,2	9
December	92,9	68,1	6,1	6,2
Mean June-Oct			19,46	18,92
Sum June-Oct	271,1	279,2		
Mean Aug-Sept			19,4	19,9
Sum Aug-Sept	110,1	114,2		

to 250 °C at a rate of 15 °C/min and maintained at this temperature for 10 min. Sterol content was determined by gas chromatography (Roche *et al.*, 2010). We introduced 50 µL of a 2 mg/mL solution of cholesterol in chloroform in to a 15 mL screw top tube. The chloroform was then eliminated by evaporation. A test run was then carried out with the addition of 100 mg of oil to the tube, followed by 2 mL of 1 M KOH in ethanol. The mixture was vortexed and heated at 75 °C in a water bath for 30 min. It was then allowed to cool to room temperature; 1 mL of distilled water was added and the mixture was vortexed. The unsaponifiable material was then extracted in 6 mL of cyclohexane. We collected 160 µL of the cyclohexane phase, which we then silylated by adding 40 µL of BSTFA/TMCS (99/1 mixture). The sample was heated for a few minutes at 103 °C and then 1 µL was injected into a Perkin-Elmer gas chromatograph equipped with an Agilent VF-5ms column (30 m long, internal diameter of 0.25 mm, film thickness of 0.25 µm) and coupled to a flame ionization detector operating at 355 °C. The carrier gas was helium, at a column head pressure of 100 kPa. The thermal conditions were as follows: 55 °C for 0.5 min, an increase in temperature of 20 °C/min to 340 °C, then maintenance at 340 °C for 30 min for the injector; 160 °C for 0.5 min, then an increase of 20 °C/min to 260 °C, then of 2 °C/min to 300 °C and 45 °C/min to 350 °C for the oven. The various sterols were identified by comparing their retention times with those of commercial standards or reference values. The sterols were quantified against an internal standard.

Tocopherol content was determined by high-performance liquid chromatography. We solubilized 10 mg of oil in 1 mL of cyclohexane. We then injected 20 µL of the resulting solution into a liquid chromatography system (Dionex) equipped with a Kromasil 100 SIL 5 µ column (250 mm long, with an internal diameter of 4 mm). A mixture of 99.5% isooctane and 0.5% isopropanol (v/v) was used as the mobile phase, at a flow rate of 1.1 mL/min. Tocopherols were detected with a fluorimeter (Dionex), with an excitation wavelength of 290 nm and an emission wavelength of 317 nm. The tocopherols present in the oil were quantified against an external standard, and were identified by a comparison of retention times with those of reference standards.

2.3 Statistical data analysis

Statistical analyses were carried out on all the plots with three analytical replications. Analyses of variance and Duncan tests for means comparison between seed development stages were applied. The statistical analyses were performed using a statistical package (Sigmastat Version 2.0, USA).

3 Results and discussion

3.1 Oil yield

Table 2 presents oil content and fatty acid composition during seed fruit development of chia. Oil yield of chia seed has been found to vary between 23.3%–28.4% at different stages of seed fruit development (Tab. 2). Oil content increased gradually fruit development and reached the highest value at 27 days after flowering (DAF). Nevertheless, this value decreased slightly at 35 DAF. This result obtained under organic cultivation are quite in the range of values already reported for different genotypes cultivated in South America (Ayerza, 1995, 2010; Ayerza and Coates, 2009, 2011) or obtained by different extraction methods (Sayed-Ahmad, 2018) or by using different solvents (Segura-Campos *et al.*, 2014). Recent study conducted in Germany revealed higher oil yield than in our study (Grimes *et al.*, 2018). This result could be explained by genotypic, environmental factor, as well as method and solvent of extraction. Indeed, the genotype and locations of cultivation differed from their climatic conditions. Moreover, Grimes *et al.* (2018) used hexane while, cyclohexane was used in our study. This difference of chemical structure may induce difference in oil extraction (Oladipo and Betiku, 2019). Since, the seeds were harvested before full maturation, the slight decrease of oil content observed at 35 DAF could be, probably, due to respiration losses (Roche *et al.*, 2016; Belo *et al.*, 2018). Accumulation of oil in oilseed crops is regulated by the “Fatty Acid Synthetase” enzymatic system, which achieves differently during fruit development phases. Thus, at earlier phases, the FA-Synthetase system was induced, and oil content was increased. When oil content reached the plateau phase, these enzymes were less active and

Table 2. Fatty acids (%) and oil (%) accumulation during seed ripening of chia seed in 2017.

Fatty acid (%)	Days after flowering			
	17	24	27	35
OY	23.3d	26.9c	28.4a	27.4b
Saturated fatty acids (SFA)				
C16:0	9.2 ± 0.0a	8.4 ± 0.1b	8.2 ± 0.0b	8.3 ± 0.1b
C18:0	4.0 ± 0.0a	3.4 ± 0.0c	3.7 ± 0.0b	3.4 ± 0.0c
Total	13.2 ± 0.0a	11.8 ± 0.1b	11.9 ± 0.0b	11.6 ± 0.1b
Monounsaturated fatty acids (MUFA)				
C18:1n7	1.1 ± 0.0c	1.0 ± 0.0c	7.7 ± 0.0a	7.4 ± 0.1b
C18:1n9	11.3 ± 0.1a	7.7 ± 0.1b	0.9 ± 0.0c	1.0 ± 0.0c
Total	12.4 ± 0.1a	8.7 ± 0.1b	8.7 ± 0.0b	8.4 ± 0.1c
Polyunsaturated fatty acids (PUFA)				
C18:2n6	22.0 ± 0.1a	19.9 ± 0.1c	20.4 ± 0.1b	20.0 ± 0.1c
C18:3n3	52.4 ± 0.2c	59.6 ± 0.2a	59.0 ± 0.0b	60.0 ± 0.3a
Total	74.4 ± 0.3b	79.5 ± 0.3a	79.4 ± 0.0a	80.0 ± 0.4a
SFA/MUFA	1.06	1.36	1.37	1.38
SFA/PUFA	0.18	0.15	0.15	0.15
ω6/ω3	0.42	0.33	0.35	0.33
Water content (%)	63.1 ± 1.2a	52.7 ± 1.0b	39.0 ± 1.1c	25.2 ± 0.9c

Data were means ± SD of three replicates. C16:0 (Palmitic acid); C18:0 (Stearic acid); C18:1n7 (vaccenic acid); C18:1n9c (oleic acid); C18:2n6c (linoleic acid); C18:3n3 a (linolenic acid); SFA/UFA (ratio saturated/unsaturated fatty acids); ω3/ω6 (ratio linolenic acid/linoleic acid); OY (oil yield). In same line, means with the same letter are not significantly different at 0.05 probability.

less efficient; this in turn reduced the rate of oil accumulation (Msaada *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2015).

3.2 Fatty acid composition

Two saturated (palmitic and stearic acids), two monounsaturated (vaccenic and oleic acids) and two polyunsaturated (linoleic and linolenic acids) fatty acids were detected during chia fruit development (Tab. 2). Saturated fatty acids (SFA) constituted 13% of total fatty acids at 17 DAF, and decreased to reach 11.6% at 35 DAF. This decrease was more marked for the monounsaturated fatty acids (MUFA). Indeed, this trait decreased by 30% between 17 and 35 DAF (Tab. 2). In contrast, polyunsaturated fatty acids (PUFA) increased from 74% (at 17 DAF) to 80% (at 35 DAF). Linolenic acid, linoleic, oleic stearic and palmitic acids were the major fatty acids (Tab. 2). Nevertheless, the fatty acids accumulation did follow neither the same trend nor the same speed. Indeed, at earlier stages of fruit development (17 DAF), palmitic, stearic, oleic and linoleic acids were at their higher level in the seed. The content of these fatty acids declined to reach its lowest level around the 35th day after flowering. Moreover, while stearic, palmitic and linoleic acids decreased slightly oleic acid declined more than ten times between 17 and 35 DAF (Tab. 2). In the same time, linolenic and vaccenic acids followed the opposite path with a progression of their content to reach the highest content between 27 and 35 DAF (Tab. 2). The ratio of ω6/ω3 followed similar trend. In fact, this ratio was highest at 17 DAF and decreased rapidly to reach a plateau at 24 DAF (Tab. 2). Similar trends have been reported in other species from different botanical families (Hamrouni-Sellami *et al.*, 2007; Msaada *et al.*, 2009; Sriti *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2015; Roche *et al.*, 2016). The ratio of unsaturated to saturated

fatty acids increased markedly from 6.6 (17 DAF) to 7.5 (24 DAF) and remained constant until complete maturity. These values are similar to those reported recently in Germany (Grimes *et al.*, 2018).

The fatty acids' accumulation seems to follow the biosynthesis dynamics as described in Kennedy pathway evolved acyl-CoA elongase and desaturases enzymes that could explain the decrease of saturated FA which served to synthesize polyunsaturated fatty acids. Moreover, in our study linoleic acid level was nearly 15% higher than results reported previously (Ayerza, 1995, 2010; Ayerza and Coates, 2009, 2011; Ciftçi *et al.*, 2012). This difference could be due to genotype and climatic conditions. Indeed, Oruro is newly released genotype which was cultivated in France for the first time. The ratio of SFA/MUFA increased by more 40% (Tab. 2) from 17 to 24 DAF, while SFA/PUFA ratio decreased for the same period from 0.18 to 0.15. Both ratios remained constant until maturity (Tab. 2). These values are similar to those reported recently in Germany (Grimes *et al.*, 2018). Moreover, ω3/ω6 ratio of the chia oils varied from 2.4 (17 DAF) to 3.0 (24–35 DAF) during the fruit development. These values are in lines with those previously reported results even in other growth conditions and other genotypes (Ayerza, 1995, 2010; Ayerza and Coates, 2009, 2011; Grimes *et al.*, 2018; Sayed-Ahmad, 2018). These values are significantly higher than those of most vegetable oils, e.g. canola oil (0.36), olive oil (0.08–0.12), soybean oil (0.15), Safflower (0.01) Atlas pistachio (0.10) and walnut oil (0.25) (Galão *et al.*, 2014; Ojeda-Amador *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2018; Beyzi *et al.*, 2019; Labdelli *et al.*, 2019; Roche *et al.*, 2019). The tocopherol content increased in same way between 17 to 24 DAF (Tab. 3). It is well known that these molecules act as antioxidant in order to protect lipids oxidation. This could explain the concomitant

Table 3. Phytosterol and tocopherols accumulation during seed ripening of chia seed in 2017.

Days after flowering (DAF)	17	24	27	35
Phytosterols (mg/100 g of oil)				
Campesterol	99.7 ± 0.6a	92.2 ± 0.8b	85.7 ± 1.6c	86.3 ± 1.1c
Stigmasterol	42.5 ± 0.3a	37.5 ± 0.9b	34.1 ± 0.6c	34.6 ± 0.7c
β-Sitosterol	460.7 ± 4.3a	454.3 ± 7.6a	431.2 ± 6.1b	429.4 ± 9.7b
Δ-5 Avenasterol	46.8 ± 2.9a	39.7 ± 0.1b	39.9 ± 1.5b	36.6 ± 0.7c
Total Desmethylsterols	649.7 ± 5.9a	623.6 ± 9.5b	590.9 ± 8.7c	586.9 ± 11.6c
Gramisterol	15.2 ± 0.1c	14.1 ± 0.2d	17.2 ± 0.1a	15.9 ± 0.2b
Citrostadienol	16.3 ± 0.3b	14.8 ± 0.0c	20.1 ± 0.6a	18.3 ± 1.5a
Cycloartenol	22.8 ± 1.4a	16.8 ± 1.0b	17.4 ± 0.7b	18.9 ± 1.4b
Methylen Cycloartanol	22.2 ± 1.2a	15.11 ± 0.5d	17.9 ± 0.8b	16.0 ± 0.2c
Total Di and Methylsterols	76.5 ± 2.8a	60.8 ± 1.4c	72.5 ± 1.5a	69.1 ± 1.9ab
Total Sterols	726.2 ± 3.1a	684.4 ± 8.1b	663.5 ± 9.2c	656.0 ± 13.2c
Days after flowering (DAF)				
Tocopherol (mg/100 g of oil)				
α-tocopherol	1.5 ± 0.1b	1.8 ± 0.1a	1.4 ± 0.0b	1.5 ± 0.1b
γ-tocopherol	38.8 ± 1.8b	45.3 ± 2.7a	47.9 ± 0.6a	47.9 ± 1.7a
δ-tocopherol	1.6 ± 0.0c	1.7 ± 0.2b	2.0 ± 0.0a	1.9 ± 0.1ab
Total tocopherols	42.0 ± 1.9b	48.8 ± 3.0a	51.3 ± 0.7a	51.4 ± 1.9a

In same line, means with the same letter are not significantly different at 0.05 probability.

accumulation of both polyunsaturated fatty acids and tocopherols in same way.

Supply of chia seeds in alimentation on rat blood plasma resulted in significant reduction of triglycerides (TG) and low-density lipoproteins (LDL) were significantly reduced, while, high-density lipoproteins (HLD) and omega-3 (PUFA) have decreased (Ayerza and Coates, 2007; Fernandez *et al.*, 2008). Relationships between fatty acids composition of diet and some diseases, like cardiovascular diseases or diabetes, have been extensively reported (Betti *et al.*, 2009). This also true for chia seed (Nieman *et al.*, 2009; Guevara-Cruz *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2012). Indeed, PUFA are necessary for the proper functioning of the brain, the eyes, and the entire nervous system and to prevent the risk of cardiovascular diseases (Corley and Tinker, 2003; Vedtofte *et al.*, 2011). Mono and polyunsaturated present an effective action in lowering total cholesterol (Gretchen and Heather, 2014; Kratz *et al.*, 2002), and reducing the risk of breast cancer (Kushi and Giovannucci, 2002). Moreover, linoleic acid helps to prevent human diseases, particularly cardiovascular disease, and certain disorders like Alzheimer's disease (Khan *et al.*, 2015). The oil of chia is composed of 75% of mono and polyunsaturated fatty acids and therefore constitutes very healthy oil for human and could increase the lowering of risks of cardiovascular diseases. Furthermore, the recommendations of the FAO as well as Food and Alimentary national Agencies, concerning the ratio saturated to unsaturated and linoleic to linolenic acids, are clearly established (FAO, 2010; Kalonji *et al.*, 2012; Schwingshackl and Hoffmann, 2012). Indeed, minimum intake values PUFA to prevent deficiency symptoms are estimated to be 2.5% of energy for linoleic acid plus 0.5% of energy for linolenic acid (FAO, 2010). For MUFA intakes, international recommendations vary greatly between 12–25%. Moreover, the ratio of linoleic to linolenic must be lesser than five (Kalonji *et al.*, 2012; Ristić-Medić *et al.*, 2013; Labdelli *et al.*, 2019). Our results showed, at 24 DAF, the chia seeds

fulfill the recommendations mentioned above (Tab. 2). This fact reinforced the great interest to harvest and use seed of chia before maturity as reported in other studies (Msaada *et al.*, 2009; Roche *et al.*, 2010b, 2016; Sriti *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2015; Belo *et al.*, 2018).

3.3 Sterols and tocopherols contents and compositions

Chia seeds contain between 656 and 726 mg/100 g of oil of total sterols. Eighty-nine percent of them are desmethylsterols represented mainly by β-sitosterol and campesterol at a level of 140 mg/100 g SDM (Tab. 3). Sterols content observed in our study were quite higher than those reported by Ciftçi *et al.* (2012) Dąbrowski *et al.* (2017) and Sayed-Ahmad (2018), who observed a range of 402–508 mg.100 mL⁻¹ of oil. These differences can be explained by both genotypic and environmental effect. As already presented, our study was based on a new cultivar developed in Europe and cultivated in France for the first time.

During seed filling and maturation of chia seeds phytosterols content was higher at 17 DAF and followed the progressive and slight decrease to reach a minimum in the whole seed at 27 and 35 DAF (Tab. 3). Sterol concentration differed according to sterol category. Desmethylsterol concentration followed similar trend that total sterols and was the highest at 17 DAF. This result was expected since desmethylsterols represented more than 89% of total phytosterols (Tab. 3). In contrast, the concentration of dimethyl- and methylsterol content varied during grain filling with the highest values were observed at 17 and 27 DAF and the lowest ones at 24 DAF (Tab. 3). Methylcycloartanol and cycloartenol (dimethylsterol category) showed higher value at 17 DAF followed by a decrease (24 DAF) and an increase after this date. In the methylsterol category, citrostadienol and gramisterol content increased also until 27 DAF then

decreased until harvest (Tab. 3). Nevertheless, the dynamics of these two categories of sterols seems to be linked. Indeed, dimethylsterols serve as precursor for the synthesis of methylsterols (Merah et al., 2012). The decrease of dimethylsterols observed at 24 DAF resulted in the increase of the level of methylsterols at 27 DAF, as reported in other species (Merah et al., 2012; Roche et al., 2016).

Tocopherols content and composition of chia during fruit development is presented in Tab. 3. Content of tocopherols varied slightly. High level of tocopherols was noticed along the fruit development. A slight decrease was observed at 24 DAF to increase again and reaching the highest value at 27 DAF. As for sterols, these results were higher than those reported in other works (Ciftçi et al., 2012; Dąbrowski et al., 2017; Sayed-Ahmad, 2018). The main isomer was γ tocopherol that represented more than 92 of the total tocopherols as already reported by (Ciftçi et al., 2012; Sayed-Ahmad, 2018). In contrast, Dąbrowski et al. (2017), who used different methods of extraction, observed nearly 5 to 7% more γ tocopherol than in our study.

The level of these compounds is not only dependent on extraction method (Dąbrowski et al., 2017), but also on genotype and environment (Sriti et al., 2011; Msaada et al., 2009; Roche et al., 2010b).

4 Conclusion

This work aimed to investigate the fatty acid, sterols compositions and oil accumulation in Chia (*Salvia hispanica* L.) seed, cultivar Oruro© released in France, from onset of seed filling until maturation. This was the first report on bioaccumulation of oil and fatty acid in chia seed. Results demonstrated that the highest oil yield was achieved at 27 DAF. Fatty acid profile varied greatly during fruit development. Linolenic acid (60% of total fatty acids at maturity) reached its higher level at 35 days after flowering. In addition, polyunsaturated fatty acids increased, whereas saturated and monounsaturated fatty acids decreased significantly during fruit development. The ratio of $\omega 6/\omega 3$ was highest at 17 DAF and lowest at 35 DAF. Therefore, if the objective is to decrease the $\omega 6/\omega 3$ ratio of it will be preferable to harvest at 35 DAF (which is not the full maturity in our study). In contrast, if the aim is to harvest higher oil content and higher tocopherol level, seed should be harvest at 27 DAF or at full maturity. Our results highlighted the possibility to seeds of chia according their components concentration. Moreover, this requires the development of techniques for harvesting, storing and probably drying of fruits. These results need to be ascertained by other field experiments.

Acknowledgments. This work benefited from the support of the Occitanie Region, European support to through the Chia'Innov (RECH no.16004168, 2017). The authors gratefully acknowledge C. Bonillo from the Mirandette experimental station in Masseur, Compagnie d'Aménagement des Coteaux de Gascogne (in Gascony, south of France) for his rigor and his help in the experiments.

Author contributions

Z.M. is the project Manager. Z.M. and O.M. conceptualization. G.G., M.C., C.P. and O.M developed the methodology

and performed the experiments and the measurements. M.C., G.G. and C.P. assisted with measurements. O.M., G.G. and Z.M. contributed to the analysis and interpretation of the data. G. G. Z.M. and O.M. contributed to data collection and to the writing of the manuscript.

Conflicts of interest. The authors declare that they have no conflicts of interest in relation to this article.

Uncited reference

Roche et al. (2010a).

References

- Ayerza R. 1995. Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *J Am Oil Chem Soc* 72: 1079–1081.
- Ayerza R. 2010. Effects of seed color and growing locations on fatty acid content and composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes. *J Am Oil Chem Soc* 87: 1161–1165.
- Ayerza R, Coates W. 2007. Effect of dietary alpha-linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *Ann Nutr Metabol* 51: 27–34. DOI: 10.1159/000100818.
- Ayerza R, Coates W. 2009. Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and α -linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) selections. *Ind Crops Prod* 30: 321–324.
- Ayerza R, Coates W. 2011. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Ind Crops Prod* 34: 1366–1371.
- Belo RG, Velasco L, Nolasco SM, Izquierdo NG. 2018. Dynamics of phytoosterols content and concentration in sunflower grains. *Crop Pasture Sci* 69: 724–732.
- Betti M, Perez TI, Zuidhof MJ, Renema RA. 2009. Omega-3-enriched broiler meat: 3. Fatty acid distribution between triacylglycerol and phospholipid classes. *Poultry Sci* 88: 1740–1754.
- Beyzi E, Gunes A, Buyukkilic Beyzi S, Konca Y. 2019. Changes in fatty acid and mineral composition of rapeseed (*Brassica napus* ssp. *oleifera* L.) oil with seed sizes. *Ind Crops Prod* 129: 10–14.
- Bohicchio R, Phillips TD, Lovelli S, et al. 2015. Innovative crop productions for healthy food: the case Chia (*Salvia hispanica* L.). In: Vastola A, ed. The sustainability of agro-food and natural resource systems in the Mediterranean Basin. Basel, Switzerland: Springer International Publishing, pp. 29–45.
- Capitani MI, Spotorno V, Nolasco SM, Tomás MC. 2012. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT-Food Sci Technol* 45: 94–102.
- Ciftçi ON, Przybylski R, Rudzińska M. 2012. Lipid components of flax, perilla, and chia seeds. *Eur J Lipid Sci Technol* 114: 794–800.
- Corley RHV, Tinker PB. 2003. The oil palm. 4th ed. Oxford, Malden MA: Blackwell Science.
- Dąbrowski G, Konopka I, Czaplicki S, Tańska M. 2017. Composition and oxidative stability of oil from *Salvia hispanica* L. seeds in relation to extraction method. *Eur J Lipid Sci Technol* 119: 1–9.
- FAO. 2010. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation, 10–14 November 2008 in Geneva. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Fernandez I, Vidueiros SM, Ayerza R, Coates W, Pallaro A. 2008. Impact of chia (*Salvia hispanica* L.) on the immune system: preliminary study. *Proc Nutr Soc* 67. DOI: 10.1017/S0029665108006216.
- Galão OF, Carrão-Panizzi MC, Mandarino JMG, et al. 2014. Differences of fatty acid composition in Brazilian genetic and conventional soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill) grown in different regions. *Food Res Int* 62: 589–594.
- Guevara-Cruz M, Tovar AR, Aguilar-Salinas CA, et al. 2012. A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. *J Nutr* 142: 64–69.
- Gretchen V, Heather R. 2014. Position of the Academy of nutrition and dietetics: dietary fatty acids for healthy adults. *J Acad Nutr Diet* 114: 136–153.
- Grimes SJ, Phillips TD, Hahn V, Capezzone F, Graeff-Hönninger S. 2018. Growth, yield performance and quality parameters of three early flowering Chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes cultivated in Southwestern Germany. *Agriculture* 8: 154. DOI: 10.3390/agriculture8100154.
- Hack H, Bleiholder H, Buhr L, et al. 1992. Einheitliche Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen – Erweiterte BBCH-Skala. *Allgemein – Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz* 44: 265–270.
- Hamrouni-Sellami I, Salah HB, Kchouk ME, Marzouk B. 2007. Variations in phytosterol composition during the ripening of Tunisian safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Pakistan J Biol Sci* 10: 3829–3834.
- Jin F, Nieman DC, Sha W, Xie G, Qiu Y, Jia W. 2012. Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women. *Plant Foods Hum Nutr* 67: 105–110.
- Kalonji E, Margaritis I, Morise A, Legrand P. 2012. Une nouvelle approche scientifique pour l'actualisation des références nutritionnelles en acides gras. Réalités cardiologiques. *Rev Gen* 4: 1–11.
- Karkanis AC, Kontopoulou CK, Lykas C, Kakabouki I, Petropoulos SA, Bilalis D. 2018. Efficacy and selectivity of pre- and post-emergence herbicides in chia (*Salvia hispanica* L.) under Mediterranean semi-arid conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 46: 183–189.
- Khan S, Choudhary S, Pandey A, Khan MK, Thomas G. 2015. Sunflower oil: efficient oil source for human consumption. *Emerg Life Sci Res* 1(1): 1–3.
- Kratz M, Cullen P, Kannenberg F, et al. 2002. Effects of dietary fatty acids on the composition and oxidizability of low-density lipoprotein. *Eur J Clin Nutr* 56: 72–81.
- Kushi L, Giovannucci E. 2002. Dietary fat and cancer. *Am J Med Sci* 113(9): 63s–70s.
- Labdelli A, Zemour K, Simon V, Cerny M, Adda A, Merah O. 2019. Pistacia atlantica Desf., a source of healthy vegetable oil. *Appl Sci* 9: 2552. DOI: 10.3390/app9122552.
- Merah O, Langlade N, Alignan M, et al. 2012. Genetic control of phytosterol content in sunflower seeds. *Theoret Appl Genet* 125: 1589–1601.
- Msaada K, Hosni K, Ben Taarit M, Chahed T, Hammami M, Marzouk B. 2009. Effects of growing region and maturity stages on oil yield and fatty acid composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit. *Sci Horticult* 120: 525–531.
- Nguyen QH, Talou T, Cerny M, Merah O. 2015. Oil and fatty acid accumulation during coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit ripening under organic agriculture. *Crop J* 3: 366–369.
- Nieman DC, Cayea EJ, Austin MD, Henson DA, McAnulty SR, Jin F. 2009. Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults. *Nutr Res* 29: 414–418.
- Ojeda-Amador RM, Salvador MD, Gómez-Alonso S, Fregapane G. 2018. Characterization of virgin walnut oils and their residual cakes produced from different varieties. *Food Res Int* 108: 396–404.
- Oladipo B, Betiku E. 2019. Process optimization of solvent extraction of seed oil from *Moringa oleifera*: an appraisal of quantitative and qualitative process variables on oil quality using D-optimal design. *Biocatal Agric Biotechnol* 20: 101187. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101187.
- Peiretti PG, Meineri G. 2008. Effects on growth performance, carcass characteristics, and the fat and meat fatty acid profile of rabbits fed diets with chia (*Salvia hispanica* L.) seed supplements. *Meat Sci* 80: 1116–1121.
- Ristić-Medić D, Vučić V, Takić M, Karadžić I, Glibetić M. 2013. Polyunsaturated fatty acids in health and disease. *J Serbian Chem Soc* 78: 1269–1289.
- Roche J, Alignan M, Bouniols A, Cerny M, Mouloungui Z, Merah O. 2010a. Sterol concentration and distribution in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) during seed development. *Food Chem* 119: 1451–1456.
- Roche J, Alignan M, Bouniols A, Cerny M, Vear F, Mouloungui Z, et al. 2010b. Sterol content in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) as affected by genotypes and environmental conditions. *Food Chem* 121: 990–995.
- Roche J, Bouniols A, Cerny M, Mouloungui Z, Merah O. 2016. Fatty acid and phytosterol accumulation during seed ripening in three oilseed species. *Int J Food Sci Technol* 51: 1820–1826.
- Roche J, Mouloungui Z, Cerny M, Merah O. 2019. Effect of sowing date on fatty acid and phytosterols patterns of *carthamus tinctoria* L. *Appl Sci* 9(14): 2839. DOI: 10.3390/app9142839.
- Rodrigues N, Casal S, Peres AM, et al. 2018. Effect of olive trees density on the quality and composition of olive oil from cv. Arbequina. *Sci Horticult* 238: 222–233.
- Sayed-Ahmad B. Étude de l'agro-raffinage de graines d'apiaceae, Lamiaceae et Chenopodiaceae pour la production de molécules biosourcées en vue d'application en industrie cosmétique. Thèse de Doctorat, INP Toulouse, 2018. 257 p.
- Schwingshackl L, Hoffmann G. 2012. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic review and meta-analyses. *Nutrients* 4: 1989–2007.
- Segura-Campos MR, Ciau-Solis N, Rosado-Rubio G, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. 2014. Chemical and Functional Properties of Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Gum. *Int J Food Sci ID* 241053, 1–5.
- Sriti J, Talou T, Faye M, Vilarem G, Marzouk B. 2011. Oil extraction from coriander fruits by extrusion and comparison with solvent extraction processes. *Ind Crops Prod* 33: 659–664.
- Vedtofte MS, Jakobsen MU, Lauritzen L, Heitmann BL. 2011. Dietary α -linolenic acid, linoleic acid, and n-3 long-chain PUFA and risk of ischemic heart disease. *Am J Clin Nutr* 94: 1097–1103.

Cite this article as: Gravé G, Mouloungui Z, Poujaud F, Cerny M, Pauthe C, Koumba IS, Diakaridja N, Merah O. 2019. Accumulation during fruit development of components of interest in seed of Chia (*Salvia hispanica* L.) cultivar Oruro© released in France. *OCL*, <https://doi.org/10.1051/ocl/2019037>

Author Queries

- Q1 Please provide the translated title [French].
- Q2 Uncited reference: This section comprises reference that occur in the reference list but not in the body of the text. Please position the reference in the text or, alternatively, delete it. Any reference not dealt with will be retained in this section.

UNCORRECTED PROOF