HAL open science

Elaboration des émulsions natives issues des graines oléoprotéagineuses et transformation catalytique de la fraction lipidique en biolubrifiants écolabellisables

Guadalupe Vaca Medina

▶ **To cite this version:**

Guadalupe Vaca Medina. Elaboration des émulsions natives issues des graines oléoprotéagineuses et transformation catalytique de la fraction lipidique en biolubrifiants écolabellisables. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2010. Français. NNT : 2010INPT0103 . tel-04275855v2

HAL Id: tel-04275855

https://theses.hal.science/tel-04275855v2

Submitted on 8 Nov 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.

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *Institut National Polytechnique de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Sciences des Agroressources*

Présentée et soutenue par *Mlle Guadalupe VACA MEDINA*
Le *12 juillet 2010*

Titre : *Elaboration des émulsions natives issues des graines oléoprotéagineuses et transformation catalytique de la fraction lipidique en biolubrifiants écolabellisables*

JURY

M. Thierry CHARDOT (Directeur de Recherche INRA à l'INRA Centre de Versailles Grignon).....Rapporteur
Mme Véronique RATAJ (Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille).....Rapporteur
Mlle Marie-Elisabeth BORREDON (Professeur à l'ENSIACET-INPT-Université de Toulouse).....Président
M. Xavier PAGES (Ingénieur Responsable du développement technologique à l'ITERG, Pessac).....Membre
Mme Magali DELEU (Chercheur qualifié FNRS à l'Université de Liège, Gembloux-Belgique).....Membre
M. Zéphirin MOULOUNGUI (Directeur de Recherche INRA à l'ENSIACET-INPT-Université de Toulouse).....Membre
Mme Corinne DUFAURE-LACAZE (Maître de Conférence à l'ENSIACET-INPT-Université de Toulouse).....Membre
Mme Amaya IGARTUA (Directeur de l'Unité de Tribologie à Tekniker, Eibar-Espagne).....Invité
M. Romain VALENTIN (Chargé de Recherche INRA à l'ENSIACET-INPT-Université de Toulouse).....Invité

Ecole doctorale : *Sciences de la Matière*
Unité de recherche : *Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle - UMR 1010 INRA/INP - ENSIACET, 4, allée Emile Monso BP 44362 - 31030 Toulouse CEDEX 4 France*
Directeur(s) de Thèse : *M. Zéphirin MOULOUNGUI*
Rapporteurs : *M. Thierry CHARDOT - Mme Véronique RATAJ*

A mes parents et mes sœurs
auxquels je dois tout
et que j'aime profondément

Mademoiselle Elisabeth BORREDON et Monsieur Antoine GASET, je vous remercie pour votre accueil au sein de votre laboratoire de recherche ainsi que de votre gentillesse à mon égard.

Monsieur Zéphirin MOULOUNGUI, je tiens à vous exprimer ma gratitude pour la confiance que vous avez mise en moi et votre aide au cours de ces travaux de recherche. Je suis très reconnaissante des moyens humains et matériels que vous avez mis à ma disposition.

Madame Véronique RATAJ et Monsieur Thierry CHARDOT, je tiens à vous remercier pour avoir accepté de juger ce manuscrit ainsi que d'avoir apporté votre avis très judicieux sur les travaux ici présentés.

Madame Corinne DUFAURE-LACAZE, je te remercie pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Je suis contente d'avoir fait ta connaissance et d'avoir pu continuer un petit peu tes travaux de thèse.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des personnes impliquées dans le Projet IBIOLAB qui a financé ces travaux. Elles ont toujours été cordiales et professionnelles pendant ces trois années de collaborations. Les réunions de travail que nous avons eues ensemble restent parmi mes moments préférés au cours de cette thèse. Je tiens à remercier de façon plus particulière Monsieur Xavier PAGES et Mesdames Magali DELEU et Amaya IGARTUA d'avoir accepté l'invitation à faire partie de cette journée. Celle-ci clôture toute cette aventure a vos côtés. Je n'oublie pas non plus Carine ALFOS et ma chère amie Julie ROIZ qui ont toujours été impliquées.

Maintenant, je tiens à remercier infiniment les gens qui m'ont formé et fortement aidé tout au long de ces travaux et sans lesquels je n'aurais pas pris autant de plaisir en le faisant : Muriel, Eric, Jean-François et Romain… surtout à ces deux derniers pour votre aide qui a été très importante dans la rédaction de ce manuscrit… Un grand merci !

De la même façon, je remercie l'ensemble du personnel de ce laboratoire. Parmi ses cadres, techniciens, ingénieurs, agents administratifs, thésards et stagiaires, j'ai eu la chance de trouver de très bons collègues ainsi que d'excellents amis qui ont fait de mon quotidien un vrai régal, soit à la paillasse, dans le bureau ou même dans les couloirs.

Un grand merci à toutes ces personnes (au sein et hors du laboratoire) qui m'ont permis de rentrer un peu plus dans leur vie privée en partageant des très bons moments ensembles : mariages, naissances, anniversaires, courses à pied, voyages, randonnées, fête d'anniversaire surprise, séances cinéma, weekends, dîners, sorties et discussions mémorables. Tout ceci m'a aidé à bien m'intégrer dans ce pays que j'aime et adopter dans celui-ci une vie qui me convient fortement.

Je n'oublie pas tous les êtres chers qui sont au Mexique. Ils ont toujours été présents en me soutenant par différents moyens tout au long de cette expérience… GRACIAS

Même si je ne veux pas citer des noms (histoire de ne pas ajouter une feuille de plus à ce manuscrit !) je ne peux pas me permettre de ne pas remercier les trois personnes qui sont devenues pour différentes raisons des êtres très chers à mon cœur et essentiels dans cette étape de ma vie loin de mon pays : Carlos pour tout ton soutien et tes conseils sans lesquels je ne serais pas ici ; Marion pour être toujours là au bon moment (j'espère avoir fait preuve que je serais toujours là pour toi), pour ton amitié sincère ainsi que pour tous ces moments de fous rires et larmes qui ont scellé notre amitié ; Jérôme car tu as pu, malgré toi, gagner mon amour fraternel et je me souviens des discussions sincères que notre confiance mutuelle nous a permis d'avoir.

Je finis par les personnes qui comptent le plus dans ma vie : mes parents et mes sœurs qui m'ont toujours encouragée dans la recherche de mon bonheur malgré le malheur que ceci a pu leur causer. Un infini MERCI à ces quatre personnes qui sont mon moteur de vie, qui ont fait de moi la personne que je suis et dans lesquels je trouve beaucoup de qualités qu'il me reste à développer. Je vous aime profondément et je suis très fière de vous avoir comme famille.

Guadalupe VACA MEDINA

SOMMAIRE

Introduction **1**

CHAPITRE 1
Procédé Intégré : Contexte et Démarche **5**

1.1 Projet IBIOLAB **7**
1.2 Contexte **9**
1.2.1 La « Chimie verte » ou Chimie durable 10
1.2.2 Réglementation 11
1.3 Ecolabels **14**
1.4 L'analyse de cycle de vie **16**
1.5 Les lubrifiants **18**
1.5.1 Le marché des lubrifiants 18
1.5.2 Biolubrifiants 20
1.5.3 Le label écologique européen pour les lubrifiants 22
1.6 Emulsions **23**
1.6.1 Types d'Emulsion 23
1.6.2 Applications des Emulsions 26
1.6.3 Elaboration des émulsions 26
1.6.4 Agents émulsionnants 30
1.6.5 Stabilité d'une Emulsion 32
1.6.6 Caractérisation des Emulsions 36
1.6.7 Emulsions comme lubrifiants 39
1.7 Oléosome **40**
1.7.1 Oléosines 41
1.7.2 Phospholipides 43
1.8 Graines oléoprotéagineuses **46**
1.9 Libération d'oléosomes **48**
1.9.1 Travaux précédents sur l'isolement d'oléosomes 49
1.9.2 Le Procédé Intégré 49
1.9.3 L'eau comme « solvant » ou milieu réactionnel 53
1.10 Conclusion **54**
1.11 Références bibliographiques **55**

CHAPITRE 2
Procédé Intégré :Approche Ingénierie Inverse **61**

2.1 Démarche : Ingénierie Inverse **63**
2.2 Purification des constituants **64**
2.2.1 Purification des oléosines 65
2.2.2 Caractérisation des oléosines 68
2.2.3 Purification de phospholipides de colza du commerce 69
2.2.4 Isolement des composants non membranaires 71
2.2.5 Purification de la trioléine 71
2.3 Activité interfaciale des constituants purifiés **72**

2.4 Reconstitution d'oléosomes 73
2.4.1 Effet de la proportion phospholipides/oléosines sur la taille de gouttelettes ... 75
2.4.2 Floculation d'oléosomes reconstitués avec différentes proportions PL/OL 76
2.4.3 Démixtion par coalescence 81
2.4.4 Effet de la présence de constituants non membranaires 82
2.5 Caractérisation de phospholipides et oléosines à l'interface huile/eau 82
2.5.1 Cinétiques d'adsorption à l'interface de constituants membranaires 82
2.5.2 Caractérisation rhéologique à l'interface huile/eau des constituants membranaires 85
2.6 Caractérisation de phospholipides et d'oléosines à l'interface air/eau 89
2.6.1 Isotherme de compression 90
2.6.2 Effet synergique entre oléosines et phospholipides 93
2.7 Conclusions 95
2.8 Références bibliographiques 96

CHAPITRE 3
Procédé Intégré : Approche Générique« in one pot » 99
3.1 Graines oléoprotéagineuses sélectionnées 101
3.1.1 Analyse des graines 102
3.2 Procédé Intégré 107
3.2.1 Broyage des graines par voie aqueuse 108
3.2.2 Mécanisme de libération des lipides à partir de la graine 122
3.2.3 Séparation des phases après broyage 124
3.3 Analyses des différentes phases obtenues après libération des lipides endogènes par le procédé intégré 127
3.3.1 Stabilité de l'émulsion issue du procédé intégré 131
3.4 Séchage de l'émulsion issue du Procédé Intégré 133
3.4.1 Technologies de séchage 134
3.4.2 Comparaison entre la lyophilisation et l'atomisation dans le séchage d'émulsions huile dans l'eau 137
3.4.3 Amélioration de la réhydratation de l'émulsion sèche 144
3.5 Emulsion issue du procédé intégré comme biolubrifiant 149
3.5.1 Caractérisation de produits 150
3.5.2 Toxicité et Biodégradabilité 152
3.5.3 Performances tribologiques de la formulation 154
3.6 Conclusions 156
3.7 Références bibliographiques 157

CHAPITRE 4
Approche Générique et Exploratoire en Lipotransformation Catalytique in situ 161
4.1 Introduction et démarche 163
4.2 Transformation in situ 166
4.2.1 Transformations chimiques des lipides 166
4.2.2 Morphologie de la graine 167
4.2.3 Lipases 168

4.3 Procédé Intégré avec hydrolyse in situ de graines de colza 171
4.3.1 Activités catalytiques de lipases testées par l'hydrolyse in situ 173
4.3.2 Séparation des fractions après transformation catalytique in situ des triglycérides endogènes de la graine de colza 176
4.3.3 Caractérisation des phases 177
4.3.4 Recyclage de la phase aqueuse 178
4.4 Méthode de séparation triphasique « three phase partitioning » 180
4.4.1 L'Etat de l'art 180
4.4.2 Démarche 181
4.4.3 Extraction des lipides par la méthode de séparation triphasique 182
4.4.4 Estérification des acides gras avec la méthode de séparation triphasique 183
4.5 Etude de l'extrapolation de la méthode de transformation in situ de lipides endogènes à d'autres matrices oléoprotéagineuses 186
4.5.1 Modifications dans le protocole opératoire du procédé intégré 186
4.5.2 Réactions d'hydrolyse in situ pour les différentes graines oléoprotéagineuses et caractérisation des phases obtenues lors du procédé intégré avec différentes graines oléoprotéagineuses 189
4.5.3 Type d'émulsion en fonction de la matrice oléoprotéagineuse 198
4.6 Avantage des milieux émulsionnés dans la transformation catalytique 199
4.7 Conclusion 199
4.8 Références bibliographiques 201

Conclusion et Perspectives 205

Partie Expérimentale 211
A.1 Méthodes d'analyse 213
A.1.1 Teneur en eau et en matières volatiles 213
A.1.2 Teneur en matière minérale 214
A.1.3 Teneur en lipides sur une matière sèche 214
A.1.4 Teneur en phosphore 215
A.1.5 Teneur en protéines par la méthode de Kjeldahl 215
A.1.6 SDS-PAGE 216
A.1.7 Teneur en constituants pariétaux 218
A.1.8 Potentiel zêta 219
A.1.9 Isothermes d'adsorption 220
A.2 Méthodes chromatographiques 220
A.2.1 Composition en glycérides 220
A.2.2 Composition en acides gras 221
A.2.3 Teneur en stérols 222
A.2.4 Teneur en tocophérols 222
A.2.5 Analyse des phospholipides par HPLC 223
A.2.6 Composition d'acides aminés 224
A.3 Méthodes microscopiques 224
A.3.1 Microscopie électronique à balayage 224
A.3.2 Observation à la loupe binoculaire pour la détermination de la taille des particules solides 224
A.3.3 Observation par microscopie optique pour la détermination de la taille des gouttelettes 225

Introduction

Introduction

La production totale de lubrifiants au niveau mondial s'est élevée à 37,4 millions de tonnes par an en 2004. Le fait que les ressources principales de ces produits soient non renouvelables provoque des contraintes dues à leur approvisionnement limité comme aussi à l'impact de ceux-ci sur l'environnement. Ces problématiques, en devenant ces dernières années des sujets d'intérêt public, incitent à l'innovation. En conséquence, des démarches vers un développement durable voient plus souvent le jour. Parmi elles, citons le développement des produits biodégradables issus des ressources renouvelables. De plus, les procédés de production doivent aussi remplir certains critères, afin qu'ils puissent obtenir la reconnaissance des organisations certifiantes suivie par celle du marché. Ainsi, nous trouvons une consommation européenne de 172 000 tonnes de biolubrifiants dans l'année 2004.

Dans ce contexte, le projet européen IBIOLAB[1] est né pour développer des biolubrifiants industriels qui puissent prétendre à l'écolabellisation. En remplaçant les huiles minérales par des huiles végétales, ce projet cherche le développement de formulations performantes et écolabellisables. Le Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, membre actif de ce projet, avec ses années d'expérience dans la valorisation non alimentaire de la biomasse, propose le développement d'un procédé qui permet la transformation des graines oléoprotéagineuses entières grâce à des traitements physiques et chimiques, pour l'obtention de milieux émulsionnés. La situation de ce projet et les travaux de recherche qui en découlent sont présentés dans le Chapitre 1. En effet, nous nous sommes intéressés à l'étude et à la mise en œuvre des systèmes à multiconstituants sous forme d'émulsion utilisables comme lubrifiants. De manière classique, les huiles émulsionnables, impliquent l'intervention de plusieurs additifs qui donnent de bonnes performances à l'emploi. Une huile émulsionnable comprend en général : une huile de base naturelle ou synthétique, des additifs (d'onctuosité, extrême pression, inhibiteur de corrosion, agent mouillant, biocide …), un système tensioactif et éventuellement un tiers solvant ou un cotensioactif. Nos travaux de recherche affichent l'ambition de développer un procédé intégré capable de fournir directement ce type de milieu émulsionnable, tout en conservant la qualité intrinsèque des composés mineurs et fonctionnels présents dans la graine, de façon à réduire voire éliminer l'ajout d'adjuvants exogènes.

[1] *Improvement of Biolubricant Manufacturing and Development thanks to the Obtaining of EcoLABels in a wide Range of Industrial Sectors. Project no.: COLL-CT-2006-030307.*

En sachant que les lipides dans la graine sont présents sous forme d'oléosomes, nous souhaitons mettre en œuvre un procédé qui permette la récupération de ces structures en l'état pour la création d'émulsions. Pour cela, il faut d'abord étudier la stabilité de ces structures natives dans l'eau. Ainsi, le Chapitre 2 présente une approche d'ingénierie inverse qui vise à comprendre le comportement des tensioactifs natifs que sont les phospholipides et les oléosines au niveau des films interfaciaux huile/eau, et d'élucider leur rôle dans la stabilité des oléosomes dans des milieux aqueux.

L'extraction conventionnelle des graines pour l'obtention d'huile comprend toute une série d'étapes. Elle implique l'utilisation de solvants organiques tels que l'hexane et des conditions opératoires sévères qui déstructurent les oléosomes. Cela provoque l'élimination des tensioactifs natifs ainsi que d'autres constituants de la graine à haute valeur ajoutée. Si nous voulons libérer les corps lipidiques contenus dans la graine, il faudra faire appel à un procédé qui ne dénature pas ces oléosomes. C'est ainsi que le Chapitre 3 présente la conception d'un procédé intégré qui permet la libération et récupération de ces structures organisées sous forme d'une émulsion. Ceci est réalisé grâce à des technologies qui permettent la déstructuration de la graine avec des contraintes mécaniques importantes, comme l'homogénéisateur haute pression, qui permettent la réduction de la taille des particules solides de la graine tout en préservant les corps lipidiques. Ce procédé est réalisé en présence d'eau qui constituera la phase continue des émulsions. De plus, ce chapitre présente des démarches mises en œuvre pour améliorer la stabilité de cette émulsion.

En allant plus loin, ces milieux émulsionnés, avec des aires de surfaces très importantes, peuvent aussi servir comme milieux réactionnels pour la synthèse post-planta d'autres produits. Dans ce cas de figure, le Chapitre 4 présente les résultats de réactions d'hydrolyse de triglycérides en milieu hétérogène et d'estérification des acides gras formés. Ces deux réactions, en plus de tirer profit d'une aire interfaciale importante, sont accélérées par des catalyseurs enzymatiques (lipases). Les milieux de synthèse chimique sont ainsi constitués d'esters d'acides gras pouvant servir de base pour les huiles émulsionnables ou huiles entières biodégradables.

Chapitre 1

Procédé Intégré :

Contexte et Démarche

1.1 Projet IBIOLAB 7
1.2 Contexte 9
1.2.1 La « Chimie verte » ou Chimie durable 10
1.2.2 Réglementation 11
1.3 Ecolabels 14
1.4 L'analyse de cycle de vie 16
1.5 Les lubrifiants 18
1.5.1 Le marché des lubrifiants 18
1.5.2 Biolubrifiants 20
1.5.3 Le label écologique européen pour les lubrifiants 22
1.6 Emulsions 23
1.6.1 Types d'Emulsion 23
1.6.2 Applications des Emulsions 26
1.6.3 Elaboration des émulsions 26
1.6.4 Agents émulsionnants 30
1.6.5 Stabilité d'une Emulsion 32
1.6.6 Caractérisation des Emulsions 36
1.6.7 Emulsions comme lubrifiants 39
1.7 Oléosome 40
1.7.1 Oléosines 41
1.7.2 Phospholipides 43
1.8 Graines oléoprotéagineuses 46
1.9 Libération d'oléosomes 48
1.9.1 Travaux précédents sur l'isolement d'oléosomes 49
1.9.2 Le Procédé Intégré 49
1.9.3 L'eau comme « solvant » ou milieu réactionnel 53
1.10 Conclusion 54
1.11 Références bibliographiques 55

CHAPITRE 1
Procédé Intégré : Contexte et Démarche

Dans ce premier chapitre, nous présentons le projet dans lequel s'intègre cette thèse ainsi que son contexte législatif. Nous exposons ensuite les questions scientifiques à l'origine du développement du procédé décrit dans ce manuscrit.

1.1 Projet IBIOLAB

L'Union Européenne participe au développement des Programmes Cadre pour la Recherche et le Développement Technologique, appelés aussi en abrégé FP (du sigle anglais Framework Program). Ces sont des programmes de financement, créés le 25 juillet 1983, en vue de soutenir et d'encourager la recherche européenne à des fins de soutien à la compétitivité de l'industrie.

Dans le cadre du sixième Programme Cadre (FP 6), en vigueur de 2002 à 2006, nous trouvons le projet IBIOLAB[1] : Improvement of Biolubricant Manufacturing and Development thanks to the Obtaining of EcoLABels in a wide Range of Industrial Sectors. Ce projet a pour objectif la mise au point de biolubrifiants pour plusieurs secteurs industriels, mise au point basée sur l'emploi de matières premières végétales et de technologies « vertes ». Dans un second temps, l'objectif est de valoriser les lubrifiants obtenus par l'obtention de l'écolabel européen[2]. Pour cela, 4 associations, 12 PMEs et 6 centres de recherche, provenant de 7 pays européens (l'Angleterre, l'Allemagne, la Belgique, l'Espagne, la France, l'Italie et la Suisse), ont été réunis afin de travailler ensemble. Les applications lubrifiantes visées par ce projet sont au nombre de six :

- les huiles pour chaînes de tronçonneuses,
- les agents démoulants,
- les huiles hydrauliques,
- les graisses lubrifiantes,

- les huiles pour moteurs à deux temps, et
- les fluides d'usinage des métaux

Dans la Figure 1 nous trouvons un schéma du panorama général du projet qui montre comment il est possible de produire des biolubrifiants en partant de matières premières végétales grâce aux procédés et aux formulations proposés par les partenaires. Le Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle, qui est l'un des six centres de recherche de ce projet, collabore dans 3 des 11 « Workpackages » qui forment ce projet :

- **Workpackage WP 4 :** production d'émulsions à partir de graines oléoprotéagineuses entières par le procédé intégré pour la formulation de fluides d'usinage des métaux
- **Workpackage WP 5 :** saponification par double décomposition et comparaison avec la saponification directe pour l'élaboration de graisses
- **Workpackage WP 7 :** production d'additifs biobasés pour la formulation de lubrifiants

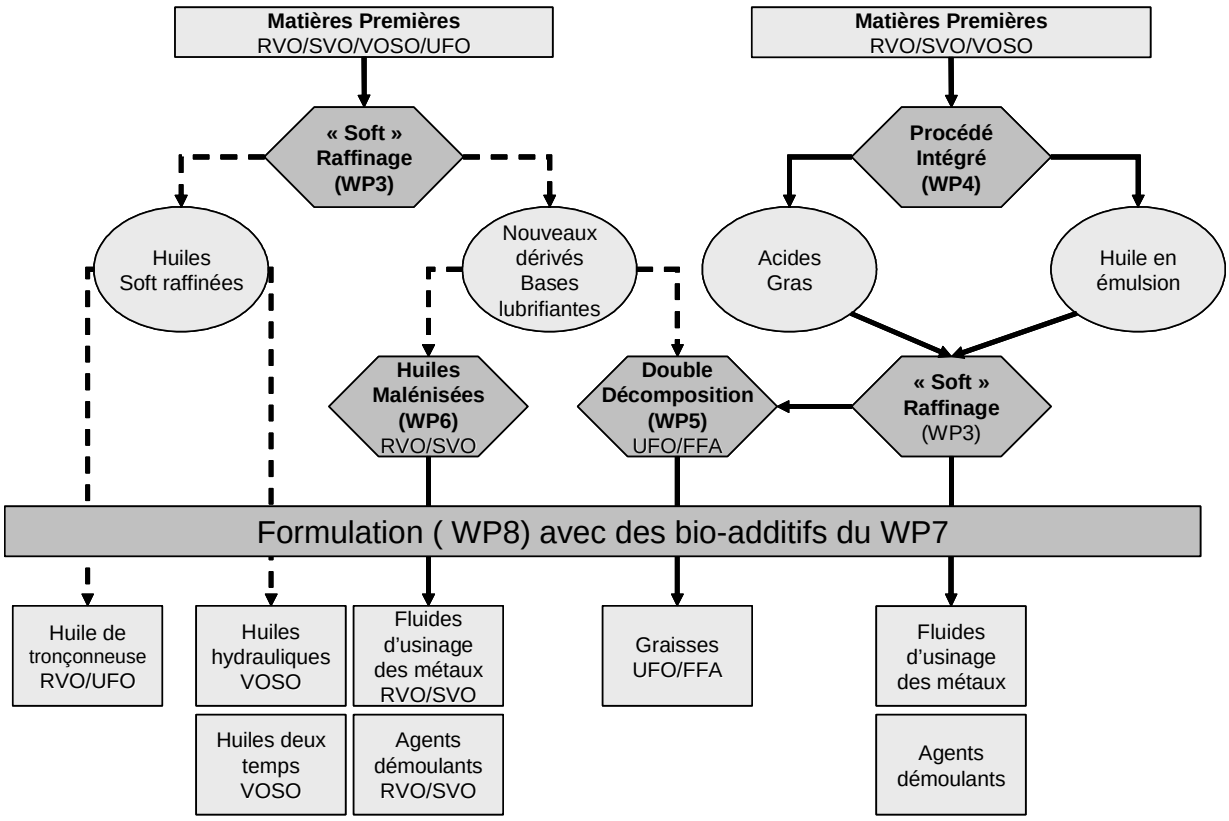


Figure 1 : Schéma de production des biolubrifiants par les procédés retenus au sein du projet IBIOLAB. RVO : huile oléique de colza, SVO : huile oléique de tournesol, VOSO : huile de tournesol riche en oléique, UFO : huile de friture usagée et FFA : acides gras

Dans le cadre de cette thèse, nous allons nous intéresser particulièrement à l'élaboration d'émulsions à partir de graines oléoprotéagineuses grâce au procédé qui sera décrit tout au long de ce manuscrit. Cependant, avant de présenter ce procédé, nous allons faire une brève description du contexte économique et environnemental auquel est confrontée la chimie d'aujourd'hui, définir un biolubrifiant et dresser un panorama général des écolabels.

1.2 Contexte

De nos jours, la demande en matières premières pour l'élaboration de produits transformés augmente de façon considérable. Elle n'est pas uniquement liée à l'augmentation de la population mondiale, mais aussi au système de consommation croissant. Cette augmentation provoque l'épuisement des ressources naturelles, notamment les ressources fossiles. Et malgré le ralentissement conjoncturel de la consommation dû à la crise financière mondiale, les réserves pétrolières finiront par ne pas pouvoir approvisionner les besoins énergétiques et matériels du monde.

Le développement durable, qui permet de répondre aux besoins du présent sans compromettre la capacité des générations futures de répondre aux leurs, est devenu la réponse à cette problématique. Mais cette démarche, qui doit être assise dans le temps et dans l'espace, n'est pas simple à mettre en place car elle prend en compte des préoccupations sociales, économiques et écologiques, qui ne sont pas toujours faciles à concilier.

Pour cela, le développement d'une chimie qui s'appuie sur les ressources renouvelables devient incontournable ; ceci implique des démarches scientifiques et industrielles ambitieuses afin d'obtenir de nouveaux produits qui puissent remplacer ceux issus du pétrole. Ces défis sont devenus plus importants pour les industriels à partir du moment où les prix des ressources fossiles ont considérablement varié.

Cette chimie nouvelle, qui exploite les ressources renouvelables comme matière première, est un des principes de base de la chimie verte.

1.2.1 La « Chimie verte » ou Chimie durable

Elle prévoit l'application de principes pour réduire voire éliminer l'utilisation ou la génération de substances dangereuses pour la santé et l'environnement[3]. Elle fait appel à de nouveaux procédés chimiques et des voies de synthèse « propres », c'est-à-dire respectueuses de l'environnement. Le concept de chimie verte, a été défini en 1998 par les chimistes américains Paul Anastas et John C. Warner, appartenant à l'Environmental Protection Agency, EPA. Douze principes la définissent[4] :

1. Il vaut mieux prévenir les déchets qu'investir dans le traitement ou l'élimination de ceux-ci.

2. Les synthèses doivent être conçues dans le but de maximiser l'incorporation des matières utilisées au cours du procédé dans le produit final.

3. Lorsque c'est possible, les méthodes de synthèse doivent être conçues pour utiliser et créer des substances faiblement toxiques ou non toxiques pour la santé humaine et l'environnement.

4. Les produits chimiques doivent être conçus de manière à préserver leur fonction primaire tout en minimisant leur toxicité.

5. Lorsque c'est possible, il faut supprimer l'utilisation de substances auxiliaires (solvants, agents de séparation...) ou utiliser des substances inoffensives.

6. Les besoins énergétiques doivent être reconnus pour les répercussions sur l'économie et l'environnement et doivent être minimisés. Il faudrait mettre au point des méthodes de synthèse dans les conditions de température et de pression ambiantes.

7. Les matières premières utilisées doivent être renouvelables plutôt que non renouvelables lorsque cela est technologiquement et économiquement réalisable.

8. Lorsque c'est possible, toute déviation inutile du schéma de synthèse (utilisation d'agents bloquants, protection/déprotection, modification temporaire du procédé physique/chimique) doit être évitée.

9. Les catalyseurs (les plus sélectifs possibles) sont plus efficaces que les réactifs stœchiométriques.

10. Les produits chimiques doivent être conçus de façon à pouvoir se dissocier en produits de dégradation non nocifs à la fin de leur durée d'utilisation, cela dans le but d'éviter leur persistance dans l'environnement.

11. Des méthodologies analytiques ont besoin d'être développées davantage afin de permettre un suivi et un contrôle en temps réel du procédé avant qu'il y ait apparition de substances dangereuses.

12. Les substances et l'état des substances utilisées dans un procédé chimique devraient être choisis de façon à minimiser les accidents chimiques potentiels, incluant les rejets, les explosions et les incendies.

1.2.2 Réglementation

Dans un contexte où l'environnement commence à prendre l'importance qu'il mérite, les démarches politiques jouent un rôle fondamental en faveur d'un mode de développement plus durable. Grâce à l'apparition de nouveaux protocoles, directives, législations et écolabels, l'industrie est contrainte (obligée ou, dans le meilleur des cas, convaincue) d'effectuer les modifications nécessaires aux procédés ou aux produits, pour les rendre moins toxiques et dangereux pour l'homme et l'environnement.

1.2.2.1 Politiques Internationales

Sur le plan international, nous retrouvons, par exemple, le Protocole de Montréal[5] (adopté le 16 septembre 1987), qui vise à réduire, et à terme à éliminer complètement, les substances qui appauvrissent la couche d'ozone. Aujourd'hui 195 pays en sont signataires. Ce protocole impose la suppression de l'utilisation des substances comme les hydrochlorofluorocarbures, tétrachlorométhane, bromochlorométhane, hydrobromofluorocarbone et méthylchloroforme, sauf pour des utilisations qualifiées de critiques ou essentielles.

Toujours au niveau international, la Convention Cadre des Nations Unies sur les Changements Climatiques, UNFCCC en anglais, a créé le Protocole de Kyoto (adopté le 11 décembre 1997)[6], avec pour objectif de réduire les émissions des six gaz à effet de serre considérés comme responsables du réchauffement climatique de ces cinquante dernières

années. Il comporte des engagements absolus de réduction des émissions pour 38 pays industrialisés, avec une réduction globale de 5,2 % des émissions de dioxyde de carbone d'ici 2012 par rapport aux émissions de 1990. Les six gaz concernés sont le dioxyde de carbone, le méthane, l'oxyde nitreux, l'hexafluorure de soufre, les hydrofluorocarbures et les hydrocarbures perfluorés ou perfluorocarbures.

Malgré les 184 pays qui ont signé et ratifié le protocole de Kyoto, celui-ci n'as pas eu le succès attendu dû principalement à l'absence des Etats-Unis. Ces derniers craignaient des répercussions négatives sur leur économie. Pour cela, l'UNFCCC a organisé un sommet à Copenhague[7] du 7 au 18 décembre 2009. Cette réunion a eu comme objectif de mettre en place des accords qui remplacent ceux du protocole de Kyoto. Elle s'est achevée sur la définition d'un texte rappelant la nécessité de contenir la hausse globale des températures à 2 °C. Les pays participants devaient déclarer, avant le 31 janvier 2010, leurs objectifs en matière de réduction de gaz à effet de serre pour 2020. Aucune organisation internationale n'est néanmoins prévue pour contrôler leurs efforts. Les pays industrialisés ont pris l'engagement de verser 10 milliards de dollars (6,9 milliards d'euros) par an en 2010, 2011 et 2012 aux pays les plus pauvres afin de les aider à faire face aux conséquences du changement climatique, avec l'objectif de porter ce montant à 100 milliards de dollars par an pour 2020. Une prochaine réunion aura lieu cette année 2010 à Mexico.

1.2.2.2 Politiques Européennes

Il existe aussi des politiques qui concernent uniquement l'Europe ; c'est le cas de la réglementation établie par le Parlement Européen et le Conseil de l'Union Européenne : REACH[8] (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of CHemicals) rentrée en application depuis le 1er juin 2007. Elle modernise la législation européenne en matière de substances chimiques. Il y aura un impact important dans les modes de fonctionnement des industriels producteurs, importateurs et utilisateurs de substances chimiques. Des bénéfices importants sont attendus en termes de protection de l'environnement et de la santé humaine, qu'il s'agisse de celle des consommateurs ou des travailleurs.

Le nouveau règlement vise progressivement à supprimer dans l'Union européenne les substances chimiques les plus dangereuses. Pour cela, il faudra :

- **Enregistrer** sur une base de données centrale toutes les informations sur les risques des substances chimiques, produites ou importées, existantes ou nouvelles, dont le volume annuel par entreprise est supérieur à une tonne ; soit 30 mille substances parmi les plus de 100 mille utilisées en Europe et répertoriées dans l'Inventaire Européen des Substances Chimiques Commerciales Existantes (EINECS en anglais).
- **Evaluer** parmi ces molécules, celles qui ont une production supérieure à 10 tonnes par an, ce qui représente 10 000 molécules. C'est à l'industriel européen producteur ou importateur, et non plus aux autorités administratives, d'évaluer et gérer les risques des substances, par des études de risques sur la santé humaine et sur l'environnement.
- **Autoriser** une utilisation encadrée (restriction) des substances chimiques les plus préoccupantes et susceptibles de provoquer des effets irréversibles graves. REACH encouragerait une politique d'innovation et de substitution des substances les plus dangereuses.

Autant d'opportunités pour encourager la recherche et le développement de nouvelles substances, seulement freinées par un coût jugé trop important par certains grands groupes industriels et sûrement rédhibitoire pour certaines PME.

Un autre système de régulation environnemental au niveau européen est la Directive des Composés Organiques Volatiles COV (VOC en anglais), qui a été adoptée le 11 Mars 1999[9]. Elle a pour objectif d'améliorer la qualité de l'air et de minimiser la formation d'ozone dans la troposphère (située entre la surface du globe et une altitude d'environ 8 à 15 km), en réduisant les émissions de COV de 67 %, par rapport aux niveaux d'émission de 1990. En plus, cette directive demande la substitution de toutes les substances volatiles déclarées cancérigènes, mutagènes ou toxiques par d'autres substances moins nuisibles.

Les COV, qui peuvent être d'origine anthropique ou naturelle, sont des composés organiques pouvant facilement se trouver sous forme gazeuse dans l'atmosphère (pression de vapeur d'au moins 0,01 kPa à 20 °C). Ils représentent un danger pour la santé humaine comme pour l'environnement, car ce sont des molécules toxiques ou cancérigènes, ou qui participent à des réactions photochimiques dans la basse atmosphère augmentant ainsi la concentration d'ozone dans celle-ci.

Cette directive, qui s'intéresse aux émissions de COV issus de l'activité humaine, concerne toutes les industries qui utilisent des solvants à l'exception des détergents et produits chimiques pour l'agriculture. Cela représente 30 branches industrielles, ce qui équivaut à 400 mille entreprises dont 90 % sont des PMEs. Concrètement, la directive propose deux alternatives principales pour atteindre son objectif :

- **Limiter les émissions :** l'utilisateur industriel est obligé de contrôler de façon continue les valeurs d'émission de gaz et ne pas dépasser les limites qui varient en fonction du secteur industriel.
- **Réduire la consommation :** l'utilisateur met en place un plan pour atteindre les réductions d'émissions de COV demandées. Soit par l'amélioration de l'efficacité du solvant, de la technologie, du procédé ou par le remplacement des COV par des produits qui sont exempts de solvants ou qui en contiennent moins.

Il est possible que certains pays décident de mettre en place leurs propres mesures ou plans afin d'atteindre ou de dépasser les objectifs fixés par ces législations. C'est le cas de la France qui s'impose volontairement la réduction par quatre des émissions des gaz à effet de serre. Les pays gardent une marge de manœuvre pour créer leurs propres politiques pour un développement durable. Un exemple d'actualité est la taxe carbone adoptée déjà par plusieurs pays.

1.3 Ecolabels

A côté des instruments qui viennent d'être cités (politiques environnementales, législations, soutien financier à la R&D), la certification est un instrument important pour stimuler à la fois l'offre et la demande de produits plus respectueux de l'environnement. Dans ce cadre, les écolabels ont clairement un rôle à jouer car ils permettent de fournir au consommateur une information pertinente et claire sur les performances environnementales des produits.

Ces écolabels sont des démarches volontaires. Ils sont attribués pour une période donnée à un type de produit, service ou producteur par une organisation certifiante. Les

écolabels reposent sur des critères explicites tenant compte du cycle de vie complet du produit (de la matière première jusqu'à la fin de vie du produit en passant par les étapes de fabrication, de distribution et d'utilisation) et ils font l'objet d'un contrôle indépendant. Les écolabels peuvent être classés en différentes catégories, par exemple selon :

- l'objet (ex. aliment issu de l'agriculture biologique) ou le service (ex. écotourisme) sur lequel ils portent,
- leur portée géographique (ex. NF environnement pour la France), ou
- leur souci ou exigence éthique (ex. commerce équitable)

Ces écolabels sont symbolisés par un logo qui, lorsqu'il est apposé sur un produit, présente au consommateur la garantie que ce produit a un impact réduit sur l'environnement (par rapport à d'autres produits similaires) pour des raisons liées au cahier des charges qui est accessible pour l'acheteur.

Les produits écolabéllisés ne représentent encore qu'un faible pourcentage du marché car, pour l'industriel, il s'agit d'une démarche volontaire et payante. Néanmoins, le nombre d'entreprises certifiées a augmenté considérablement ces dix dernières années, ce qu'illustrent les 804 entreprises en Europe certifiées avec le label écologique européen[10]. Parmi tous les écolabels existants, nous signalerons les deux les plus importants en France :

Le label écologique européen, créé en 1992, qui est le seul label écologique officiel européen utilisable dans tous les pays membres de l'Union Européenne. Il est délivré en France par AFNOR Certification (Association Française de NORmalisation), organisme certificateur indépendant. C'est une marque volontaire de certification de produits et de services. Le label écologique communautaire repose sur le principe d'une approche globale qui prend en considération le cycle de vie du produit à partir de l'extraction des matières premières, la fabrication, la distribution, et l'utilisation jusqu'à son recyclage ou son élimination après usage. La qualité et l'usage sont également pris en compte.

La marque NF Environnement, créée en 1991, est l'écolabel français, délivré aussi par AFNOR Certification. C'est une marque volontaire de certification de produits et de services. Cette marque est destinée à certifier, tout au long de leur cycle de vie, que les produits ou services sur lesquels elle est apposée présentent un impact négatif moindre sur l'environnement et une qualité d'usage satisfaisante par rapport à d'autres produits ou services analogues présents sur le marché.

Nous trouvons aussi d'autres écolabels nationaux pour chaque pays européen : Blue Angel (Allemagne), Nordic Swan (Pays Nordiques), Swedish Standards (Suède), Austrian Ecolabel (Autriche) et Hungarian Ecolabel (Hongrie).

Face à la diversité des écolabels existants les industriels voulant faire reconnaître leur démarche environnementale vont devoir opérer un choix qui sera déterminé par rapport aux exigences du marché ou de leurs clients. Pour le marché des biolubrifiants, plusieurs parties prenantes pensent qu'il serait souhaitable d'aller dans le sens d'une harmonisation des écolabels vers l'écolabel européen qui est considéré comme une bonne synthèse des autres écolabels nationaux afin d'éviter la confusion qui naît de la profusion des labels.

1.4 L'analyse de cycle de vie

L'analyse de cycle de vie, essentielle pour l'obtention du label écologique européen, est un instrument qui permet d'évaluer les impacts environnementaux associés à un produit tout au long de son existence. Cette méthode, apparue dans les années 70, commence à être utilisée en gestion de l'environnement, notamment depuis sa normalisation avec la série des normes ISO 14040 qui concerne cette gestion.

Le fait de prendre en considération tout le cycle de vie d'un produit, permet d'avoir un regard plus complet sur l'impact réel d'un objet précis sur l'environnement. Il prend en compte tous les besoins en ressources et en énergie, depuis l'extraction des matières premières jusqu'à son traitement en fin de vie, en passant par les étapes de fabrication, distribution,

utilisation, recyclage et valorisation (Figure 2). Ceci demande beaucoup d'informations qui ne sont pas toujours faciles à obtenir car elles impliquent des renseignements que les acteurs ne sont pas capables de fournir. Cependant, il y a de plus en plus de données répertoriées et accessibles à mesure que des analyses de cycle de vie sont accomplies.

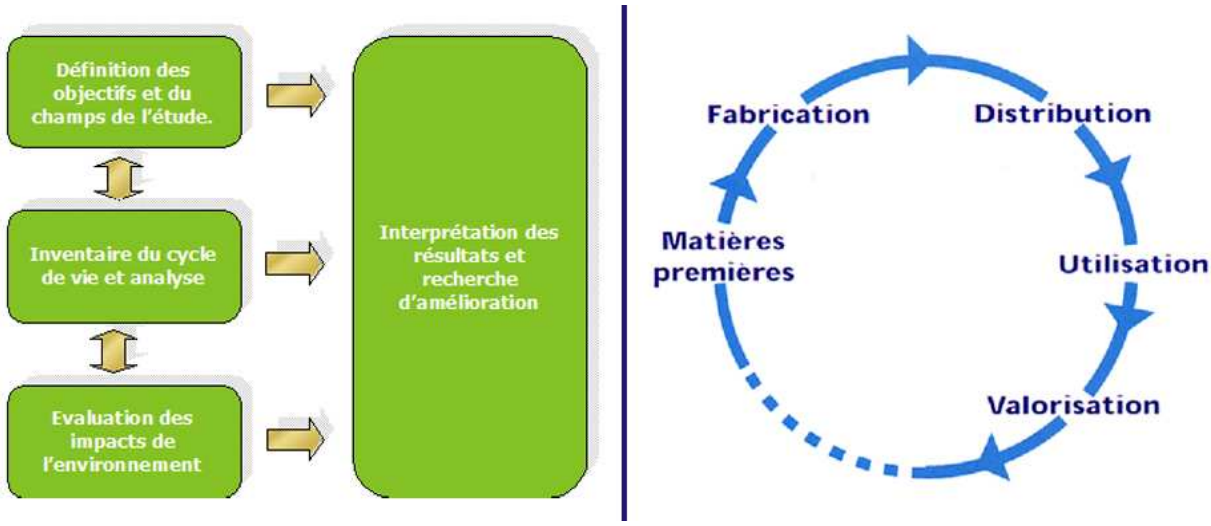


Figure 2 : Schéma avec les différentes étapes de l'analyse de cycle de vie (à gauche) et les étapes du cycle de vie d'un produit (à droite)

L'analyse de cycle de vie est un processus itératif constitué de 4 étapes principales (Figure 2), dont la structure est standardisée par la norme ISO 14044 :

- La définition des objectifs et du champ de l'étude
- L'inventaire du cycle de vie et l'analyse
- L'évaluation des impacts sur l'environnement
- L'interprétation des résultats

Le fait que la méthodologie soit itérative permet de revenir en arrière à chacune des étapes pour réaliser des modifications qui peuvent améliorer les résultats si ces derniers sont insatisfaisants. Il semble pertinent d'indiquer que cet outil est fait pour analyser la fonction d'un produit plutôt que le produit lui-même, car ceci facilite la comparaison entre les résultats de différentes analyses. C'est ainsi que McManus réalise l'analyse de cycle de vie d'huiles de colza en comparaison avec des huiles minérales pour l'utilisation dans des systèmes hydrauliques[11]. D'après lui, les huiles minérales sont plus performantes que les huiles de colza, ce qui fait que le résultat global de l'analyse de cycle de vie favorise les huiles

minérales malgré le bon bilan des huiles de colza concernant leurs faibles émissions lors de leur production. Nous devons ainsi prendre ce résultat comme une incitation à une amélioration de la performance des produits d'origine végétale.

1.5 Les lubrifiants

La tribologie est une science proposée en 1968 par G. Salomon qui a pour but d'étudier les phénomènes susceptibles de se produire entre deux objets en contact, immobiles ou animés de mouvements relatifs. Il recouvre, entre autres, tous les domaines du frottement, de l'usure et de la lubrification.

La fonction principale d'un lubrifiant est de réduire la friction et l'usure à l'origine du mouvement relatif entre deux surfaces solides. Selon l'application concernée, il peut également permettre de dissiper la chaleur (fluides de coupe pour le travail des métaux), d'évacuer les impuretés, d'éviter la corrosion (huiles de moteurs) ou de transmettre des forces (fluides hydrauliques).

La lubrification comprend ainsi des secteurs d'application très diversifiés, ce qui demande des exigences techniques différentes. C'est ainsi que presque 10 mille formulations différentes sont nécessaires pour répondre à 90 % des applications[12]. Au niveau de leur composition, les lubrifiants sont des préparations qui consistent classiquement en :

- un fluide de base qui est le constituant majoritaire du lubrifiant,
- des additifs dont la fraction dans le produit fini peut-être inférieure à 1% et aller jusqu'à 30%. Ces additifs sont destinés soit à renforcer certaines propriétés intrinsèques des huiles de base soit à leur apporter des propriétés qu'elles ne possèdent pas ou peu naturellement. La nature et la quantité des additifs sont exactement adaptées à l'application pour laquelle le lubrifiant est destiné.

1.5.1 Le marché des lubrifiants

De nos jours, où l'économie d'énergie et des ressources est devenue un sujet d'actualité mondiale, l'industrie est préoccupée par une meilleure performance énergétique et

une plus longue durée de vie de ses équipements. C'est pourquoi l'intérêt de l'emploi de lubrifiants augmente. En 2004, 37,4 millions de tonnes de lubrifiants ont été consommées au niveau mondial. Même si il y a eu une augmentation de 12,3 % par rapport à 1970, celle-ci n'est pas en relation avec l'explosion démographique (+72,5 % pour la même période) ; cela s'explique par une diminution dans la consommation due à une amélioration des performances permettant d'augmenter la durée de vie du produit[12].

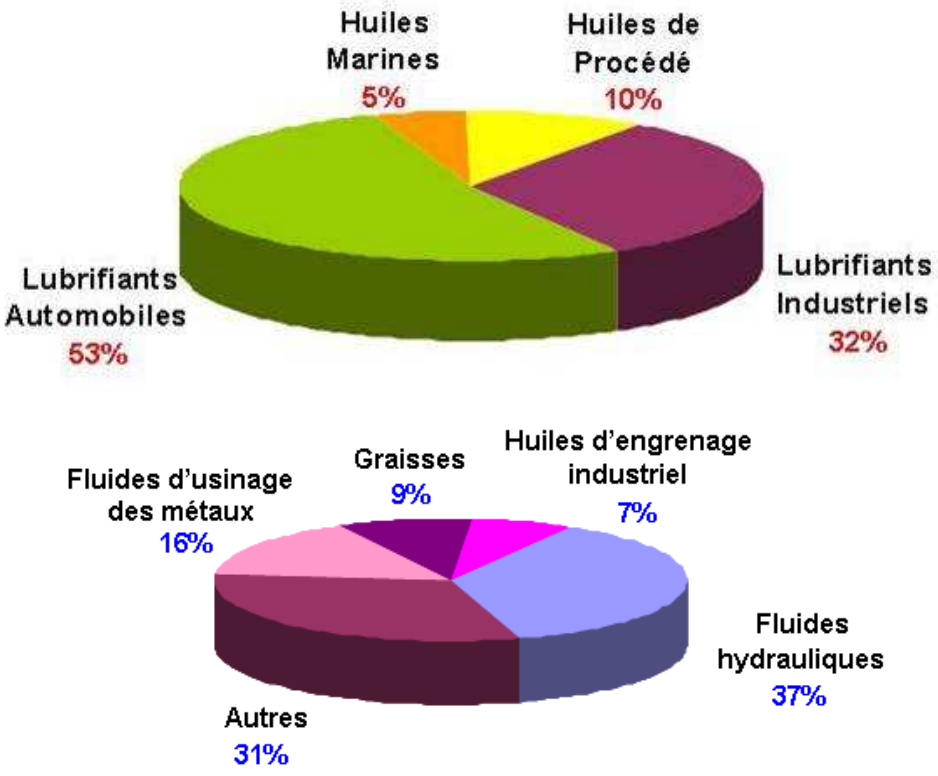


Figure 3 : Proportions des lubrifiants produits en 2004[12]

Historiquement, les lubrifiants sont classifiés en deux groupes : les lubrifiants automobiles et ceux pour l'industrie. Ces derniers peuvent être divisés en huiles de procédé et lubrifiants industriels. Les lubrifiants industriels sont principalement des graisses, des fluides pour le travail des métaux et des films lubrifiants solides. Dans la Figure 3 sont représentés les pourcentages consommés au niveau mondial pour l'année 2004. Ils représentent une industrie qui vaut 48,8 milliards de dollars. Il est prévu une augmentation de la production pour atteindre les 40,5 millions de tonnes en 2012[13]. Dans le monde, il existe 1 380 producteurs de lubrifiants. Cependant, 1 % d'entre eux emporte 60 % des ventes totales.

Dans le marché actuel, les lubrifiants sont en majorité issus de la pétrochimie. Cependant, il existe des substituts de qualité de ces lubrifiants minéraux: les lubrifiants à base d'huiles végétales ou de leurs dérivés. Ces derniers trouvent donc leur importance notamment dans les applications où la récupération des lubrifiants est quasi-impossible ou sujettes à des pertes accidentelles (dans le sol, les eaux,…). Les réglementations de plus en plus strictes concernant l'environnement et la santé des travailleurs participent notamment au développement de ce type de lubrifiants.

1.5.2 Biolubrifiants

Contrairement au marché des lubrifiants minéraux classiques, pour lequel des systèmes de statistiques existent, comme celui du Centre Professionnel des Lubrifiants (C.P.L.) pour la France ; il n'existe pas de système statistique harmonisé pour les biolubrifiants (au niveau national, européen ou mondial). Il est donc très difficile de trouver des chiffres récents et pertinents sur ce marché.

On estime cependant que les biolubrifiants représentent 3-5% du marché européen total des lubrifiants. Le Tableau 1 contient une compilation de données de la littérature. Plutôt que de chiffres basés sur le volume réel des ventes, il s'agit ici d'indications ou d'estimations. On notera également l'absence d'uniformité entre les données qui se réfèrent à différentes entités (lubrifiant biodégradable, lubrifiant biobasés, esters synthétiques….etc) et qui sont éparses dans le temps. Nous observons une disparité entre les chiffres des différentes références. Cela peut s'expliquer par un manque d'homogénéité dans le concept de biolubrifiant qui fait prendre en compte ou pas toute une série de produits.

Le label écologique européen pour les lubrifiants établi en 2005, constitue un premier pas vers une définition commune de ce que peut être un biolubrifiant. Ce label connaît un succès grandissant. Le nombre de produits ayant reçu la certification n'a cessé d'augmenter et aujourd'hui 70 produits lubrifiants ont une licence. Ceci suggère un intérêt et une activité accrue des entreprises pour introduire et gagner des parts sur le marché des biolubrifiants. Cependant, il est évident que l'écolabel européen, seul, ne sera pas suffisant pour fondamentalement accroître ce marché.

Tableau 1 : Marché Européen de biolubrifiants (x1000 tonnes)[14-18]

Catégorie du lubrifiant	Biolubrifiants		Lubrifiants commercialisés comme biolubrifiant	Lubrifiants biodégradables	Huiles végétales	Esters de synthèse	Total des biolubrifiants
Année	1999[14]	1999[15]	1999[16]	2000[17]	2004[18]		
Huiles pour moteur automobile	ND				0	22	22
Huiles pour moteur deux temps			2	1	1	1	2
Huiles pour moteur d'avion					0	10	10
Huiles d'engrenage pour moteur		4,5					
Huiles d'engrenage automobile					0	4	4
Huiles d'engrenage industriel					1	2	3
Huiles d'engrenage			1				
Fluides hydrauliques		51	51	20	17	22	39
Graisses		1	1,7	0,6	2	3	5
Huiles pour chaînes de tronçonneuses		29	29	10	17	3	20
Agents demoulants		10,5	10,65	2,5	12	3	15
Fluides d'usinage des métaux		4,5	4		5	20	25
Anti-corrosion				0,6			
Huiles pour compresseurs					0	15	15
Huiles pour textiles					1	2	3
Autres lubrifiants					2	7	9
TOTAL	**102**	**96,5**	**96,35**	**34,3**	**58**	**114**	**172**

La normalisation est un élément nécessaire pour le développement harmonieux et la commercialisation des produits innovants. Dans le cadre de l'Initiative Marchés Porteurs lancée pour soutenir notamment le marché des produits biobasés, la Commission européenne a mandaté le Comité Européen de Normalisation (CEN) afin d'élaborer des spécifications

techniques (qui évolueront vers une norme dans un second temps) pour les biolubrifiants[19]. Ces spécifications s'articuleront autour des critères suivants : biodégradabilité, contenu en matières premières renouvelables, fonctionnalité du produit et impact sur les émissions de gaz à effet de serre. En palliant le manque actuel de définition/norme, ces travaux de normalisation sont un élément clé pour le développement futur de ces produits.

1.5.3 Le label écologique européen pour les lubrifiants

Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'objectif du projet sur lequel s'articule cette thèse, est de créer des biolubrifiants qui puissent obtenir le label écologique européen. Pour cela, une liste de sept critères définit les spécifications techniques et écologiques des biolubrifiants. Ces critères ont pour objectif de promouvoir les produits qui induisent les plus faibles dommages sur les eaux et sols lors de leur emploi et qui provoquent les plus faibles émissions de CO_2. Le label écologique européen définit les critères suivants :

1. Il interdit les produits présentant des phrases de risque (phrases R) indiquant un danger pour l'environnement et pour la santé.
2. Il présente des exigences de toxicité aquatique pour le produit complètement formulé mais aussi pour chaque composant.
3. Il révèle le potentiel de biodégradabilité et de bioaccumulation. Pour chaque catégorie de produit un certain pourcentage de produits non biodégradable est autorisé.
4. Il interdit les composants organiques halogènes, les nitrites et les métaux ajoutés sauf Na, K, Mg, Ca, Li et Al.
5. Il fixe des teneurs minimales en carbone d'origine renouvelable dans le produit.
6. Il définit les performances techniques du produit.
7. Le dernier critère oblige à faire apparaître sur l'emballage du produit l'allégation « Dommage réduit pour l'eau et le sol durant l'utilisation ; émissions de CO2 réduites »

Il faut signaler que parmi toutes les filières lubrifiantes, il y a quelques groupes qui sont concernés par l'obtention d'un label écologique européen. C'est le cas des huiles pour chaînes de tronçonneuses, les agents démoulants, les huiles hydrauliques, les graisses lubrifiantes, les huiles pour moteurs à deux temps et les autres lubrifiants « totalement

perdus », c'est-à-dire, les lubrifiants qui ne peuvent être collectés en usage normal et qui se répandent dans l'environnement, comme c'est le cas avec les fluides d'usinage des métaux.

Lors de cette thèse, nous allons nous intéresser aux lubrifiants qui sont sous forme émulsifiée et qui peuvent être utilisés comme fluides d'usinage des métaux. Nous comptons développer un procédé qui permet de libérer des lipides végétaux sous forme d'émulsion. Le marché des fluides d'usinage des métaux représente un potentiel considérable au niveau européen avec ses 430 000 tonnes par an, car le taux de pénétration des biolubrifiants sur cette filière n'est que de 5,8 %.

1.6 Emulsions

Une émulsion est définie comme un mélange homogène de deux substances liquides non miscibles, où une de ces phases est dispersée dans l'autre. Cet ensemble qui en principe n'est pas stable thermodynamiquement, peut présenter une stabilité « temporaire » notamment par l'utilisation d'un émulsifiant. Les émulsions, qui font partie des milieux dispersés, peuvent être de différents types en fonction de la concentration et de la nature des constituants comme aussi du procédé émulsifiant.

1.6.1 Types d'Emulsion

Le système huile-eau est le plus étudié, car il est prépondérant dans notre entourage. Ce système peut trouver deux conformations simples, selon la phase dispersée : les émulsions « huile dans eau », appelées aussi directes, H/E ou O/W (*oil in water*), où la phase dispersée est l'huile ; et les émulsions « eau dans huile », appelées inverses, E/H ou W/O (*water in oil*), qui correspondent au cas contraire.

Il est possible de trouver d'autres conformations pour ce système. Il s'agit des émulsions multiples qui correspondent aux émulsions d'émulsion, c'est-à-dire, une émulsion dans laquelle deux types d'émulsion coexistent[20]. Cela signifie que, pour une « émulsion multiple dite E/H/E », les particules huileuses dispersées dans la phase aqueuse renferment elles-mêmes une ou plusieurs gouttelettes d'eau. Pour une « émulsion multiple dite H/E/H » les particules aqueuses dispersées dans la phase huileuse renferment elles-mêmes une ou

plusieurs gouttelettes d'huile (Figure 4).

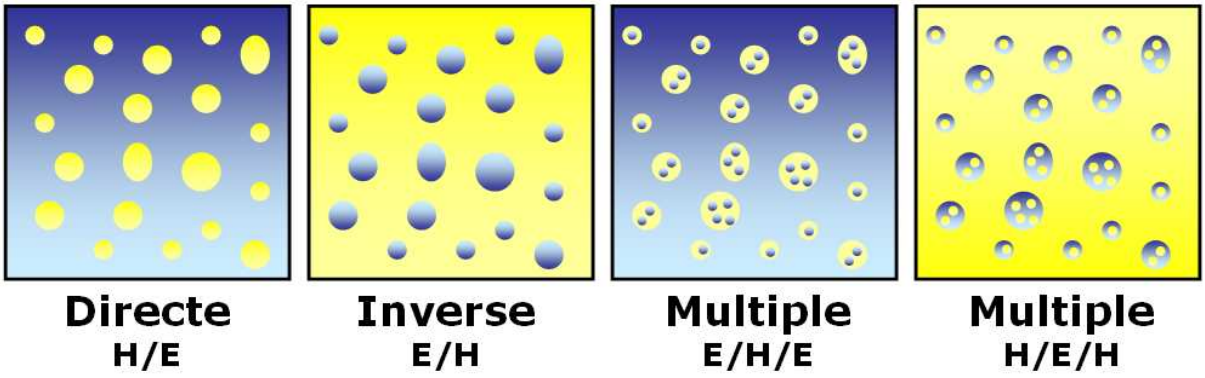


Figure 4 : Différents types d'émulsions où l'eau est représentée par la couleur bleue et l'huile par la couleur jaune

Les différentes formes que peut prendre une émulsion imposent une connaissance approfondie des paramètres qui influent sur ces dernières. Ces paramètres sont classés dans trois types de variables :

- Les variables de formulation qui concernent la nature de l'agent émulsifiant et de l'huile, la salinité et la température. Elles sont rassemblées en une seule variable de formulation généralisée appelée HLD (Différence Hydrophile-Lipophile).
- Les variables de composition qui correspondent aux rapports entre les constituants : la phase aqueuse, la phase huileuse et l'agent émulsifiant.
- Les variables de procédés qui incluent l'ordre d'incorporation des constituants, la géométrie du dispositif d'agitation, la vitesse d'agitation...

La variable de formulation HLD, est un nombre sans dimension qui établit une relation entre les variables de formulation par une somme algébrique de divers facteurs. Cette variable est définie par les équations suivantes selon le tensioactif employé[21] :

$$HLD = \sigma + \ln S - kACN + t\Delta T + aA \qquad \text{Tensioactif ionique}$$

$$HLD = \sigma - EON + bS - kACN + t\Delta T + aA \qquad \text{Tensioactif non ionique}$$

où :

EON nombre de groupes « oxyde d'éthylène » des tensioactifs non ioniques polyéthoxylés

S salinité de l'eau exprimée en pourcentage massique de NaCl dans l'eau

ACN nombre d'atomes de carbone de la molécule de n-alcane

ΔT est la différence de température par rapport à celle de référence (25 °C)

A est le pourcentage pondéral d'alcool éventuellement ajouté

σ, α, k, t sont les paramètres caractéristiques du tensioactif considéré

a est la constante caractéristique de l'alcool et du type de tensioactif

b est la constante caractéristique du sel éventuellement ajouté

La Figure 5 montre l'effet que les variables de formulation et de composition ont sur le type d'émulsion obtenu. Nous observons comment, avec des quantités semblables d'huile et d'eau, c'est la variable de formulation (HLD) qui détermine le type d'émulsion. Cependant, nous confirmons l'existence de deux régions qui correspondent à la formation des émulsions multiples, appelées « anormales » car leur phase externe n'est pas celle prévue par la formulation.

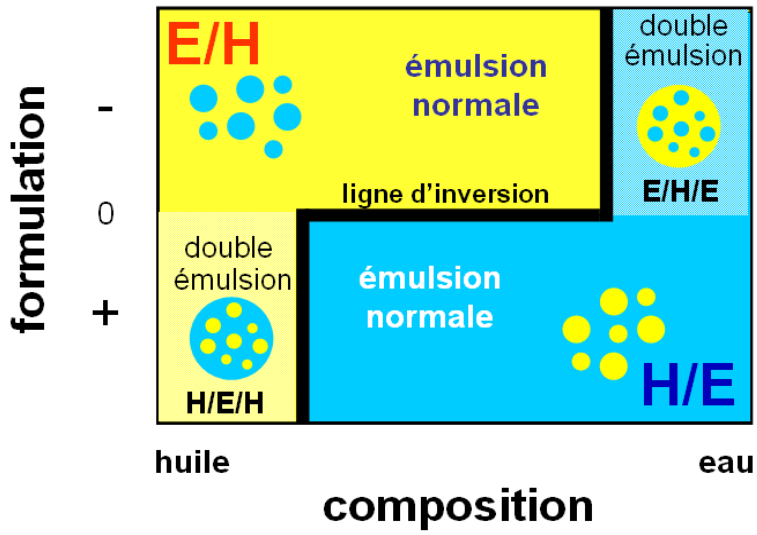


Figure 5 : Schéma de la carte bidimensionnelle qui montre l'effet de la composition et de la formulation dans le type d'émulsion[21]

Quand les deux liquides immiscibles commencent à former des configurations composées, il arrive que l'homogénéité de la conformation ne soit pas régulière. C'est à ce moment-là que nous parlons d'émulsions complexes, qui présentent plusieurs zones avec des

conformations particulières. Ces sont des émulsions qui présentent souvent une stabilité encore moins importante que celle des émulsions multiples.

1.6.2 Applications des Emulsions

Les émulsions sont toujours présentes dans notre vie quotidienne ; nous les trouvons dans des produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques comme aussi dans le monde agricole et industriel. Nous pouvons citer comme exemples le lait, la mayonnaise, la vinaigrette, les crèmes hydratantes, les lotions…

L'importance des milieux émulsifiés réside dans les bénéfices qu'ils peuvent nous apporter. Par exemple, ils protègent les principes actifs, améliorent l'aspect visuel et tactile des aliments, facilitent l'application et le dosage des produits.

1.6.3 Elaboration des émulsions

Pour préparer une émulsion, tout d'abord, deux liquides non miscibles sont nécessaires : une phase non polaire (liquide non associé, où ne sont échangées que des interactions de type Lifshitz-Van der Waals notées LW) et une phase polaire (liquide associé, où sont échangées à la fois des interactions de type LW et des interactions de type acide-base de Lewis [par exemple, liaison hydrogène] notées AB). C'est l'absence d'interactions acide-base à l'interface entre les deux liquides qui est précisément responsable de la non-miscibilité[22]. Dans la plupart des cas, la phase polaire est une solution aqueuse. Pour la phase non polaire, nous trouvons les huiles minérales, les alcools et acides gras longs, les composés estérifiés entre autres.

Comme les deux liquides mis en présence ne sont pas miscibles, pour mélanger les phases, nous devons ajouter de l`énergie. Celle-ci sert à créer une très grande interface entre les deux phases. L'énergie de formation de l'émulsion, ΔG_{form}, peut ainsi s'écrire :

$$\Delta G_{form.} = G_f - G_i = \Delta H_{form} - T\Delta S_{form} = \gamma\Delta A - T\Delta S_{form}$$

où :

ΔH_{form} est la différence d'enthalpie entre l'état final et initial (J)

ΔS_{form} est la différence d'entropie entre ces deux états (J/°K)

T est la température à la quelle cette formation a lieu en degrés Kelvin (°K)

ΔA est l'augmentation de l'aire de contact entre les deux phases (m^2)

γ est la tension interfaciale (J/m^2)

ΔH_{form} est l'énergie nécessaire pour créer un mètre carré de surface. A moins d'avoir une tension interfaciale très faible (cas des microémulsions), le terme entropique ΔS_{form} est négligeable et cette différence d'énergie est positive. Ainsi, l'émulsion est un état thermodynamiquement moins stable que le système initial. Ainsi, pour créer une émulsion, il faut vaincre la tension interfaciale et fournir l'énergie $\gamma\Delta A$.

Nous fabriquons une émulsion en appliquant aux deux liquides concernés une énergie mécanique. L'interface se déforme alors jusqu'à la formation de gouttelettes. Les gouttelettes résultantes sont en général trop grosses et doivent être divisées en très petites gouttelettes. En effet, cette déformation de la phase dispersée aura comme résultat une création de surface qui, à son tour, formera des gouttelettes. Les gouttelettes se mettront sous forme sphérique car il s'agit de la configuration volume/surface la plus avantageuse.

Bien qu'une agitation manuelle suffise parfois comme énergie mécanique, un moyen d'agitation électrique est le plus souvent indispensable pour l'obtention d'émulsions ayant une durée de vie importante. Différents moyens mécaniques de dispersion sont utilisables : hélice, mélangeur statique, broyeur colloïdal, ultrasons ou homogénéisateur à haute pression. Le type de système de dispersion est à choisir en fonction de la finesse désirée pour l'émulsion.

Le Tableau 2 fait un récapitulatif des principaux systèmes conçus pour la fabrication des émulsions. Parmi toutes ces techniques, certaines sont utilisées uniquement à l'échelle laboratoire (secoueurs, vibreurs, transducteurs magnétostrictifs, courant électrique, vaporisateurs, condensateurs). Les méthodes les plus impliquées dans les applications industrielles sont les rotor/stator, les moulins à colloïdes, les homogénéisateurs haute pression et les ultrasons. L'emploi de deux techniques combinées est souvent réalisé[23].

Tableau 2 : Différentes techniques utilisées pour fabriquer des émulsions[23]

Technique	Technique comparable	Mécanisme principal	Densité d'énergie	Mode opératoire
1. Secouage	agitation simple (4a)	turbulence	faible	batch
2. Ecoulement a) laminaire b) turbulent	 5 4a	 forces visqueuses turbulence	 faible-moyen faible-moyen	 continu continu
3. Injection (jet)	10a	turbulence, cavitation et forces de cisaillement	faible	continu
4. Agitation a) simple b) rotor/stator c) racleur d) vibreur	 1,2b 5 5 8a	 turbulence, forces visqueuses turbulence, forces visqueuses forces visqueuses cavitation et turbulence	 faible moyen-élevé faible-moyen faible	batch ou continu
5. Moulin à colloïdes	2a, 4c, 6	forces visqueuses	moyen-élevé	continu
6. Broyeur à billes et à galets	5	forces visqueuses	moyen	batch ou continu
7. Homogénéisateur haute pression	2b	turbulence, cavitation et forces visqueuses	élevé	continu
8. Ultrasons a) couteau vibrant b) magnétostriction	 4d	 cavitation et turbulence cavitation	 moyen-élevé moyen-élevé	 continu batch ou continu
9. Courant électrique	10b	charge électrique	moyen	batch ou continu
10. Aérosols a) mécanique b) électrique	 3 9		 faible-moyen moyen	batch ou continu
11. Moussage ou ébullition		étalement	faible-moyen	
12. Membrane		étalement	faible	continu
13. Condensation		étalement	faible	batch

Il faut mentionner qu'il existe des méthodes d'émulsification qui nécessitent peu ou pas d'énergie mécanique, comme l'inversion de phase ou l'émulsification spontanée. L'inversion de phase permet de fabriquer une émulsion fine à partir d'une émulsion grossière

en augmentant progressivement la quantité de phase dispersée, jusqu'à une fraction volumique critique où l'émulsion va soudainement s'inverser[24]. L'émulsification spontanée ou autoémulsification ne requiert aucune agitation mécanique[25].

Aussi dans le Tableau 2, les principaux mécanismes impliqués dans chacune des techniques sont indiqués. Les gouttelettes peuvent en effet se déformer et se rompre sous l'effet des forces visqueuses ou d'inertie. Les premières génèrent des contraintes tangentielles ou perpendiculaires à la surface de la goutte, tandis que les deuxièmes génèrent des différences de pression. En pratique, on distingue les trois cas suivants: écoulement laminaire, écoulement turbulent et cavitation :

- Dans l'écoulement laminaire, les forces visqueuses sont prédominantes.
- Dans l'écoulement turbulent, ce sont principalement les forces d'inertie qui entrent en jeu, mais les forces visqueuses ne sont pas négligeables.
- Dans la cavitation, de petites bulles de vapeur se forment et disparaissent très rapidement, ce qui entraîne l'apparition d'ondes de choc dans la phase continue. Le liquide est alors fortement agité et il apparaît des zones de turbulence.

Cependant, l'énergie apportée ne doit pas être forcément maximale mais judicieusement dosée car il s'agit de trouver un équilibre entre la division et la fusion/coalescence des gouttelettes.

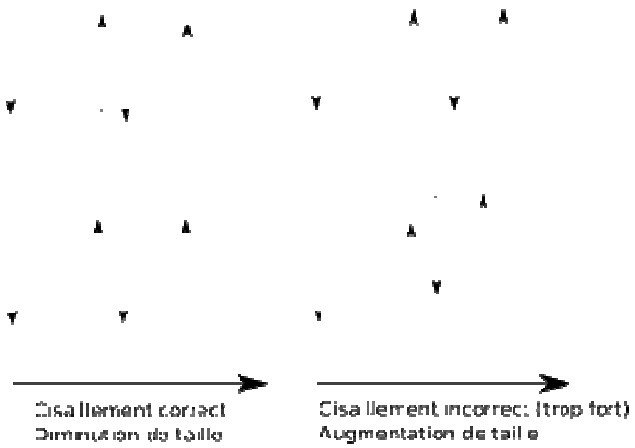


Figure 6 : Effet du cisaillement sur la taille des gouttelettes

Pour que l'émulsion soit durable, c'est-à-dire que l'état dispersé demeure lorsque l'agitation mécanique cesse, il est nécessaire d'utiliser un agent émulsionnant ou émulsifiant. Bien qu'il puisse aussi faciliter le phénomène de dispersion en abaissant la tension interfaciale, le rôle de l'agent émulsifiant est aussi de stabiliser le système dispersé en inhibant les phénomènes de dégradation.

1.6.4 Agents émulsionnants

Parmi les agents émulsionnants, nous pouvons citer les tensioactifs, les polymères, les cristaux liquides et les solides divisés[26]. Les émulsionnants les plus largement utilisés sont les tensioactifs. Nous présentons ci-dessous quelques notions de physico-chimie de ces agents.

1.6.4.1 Tensioactifs

Un tensioactif est une molécule dotée d'un pôle hydrophobe capable uniquement d'interactions de LW et d'un pôle hydrophile capable de développer les interactions de LW, des interactions AB telles que la liaison hydrogène et éventuellement des interactions électrostatiques. De par sa structure, le tensioactif tend à s'accumuler dans les zones interfaciales. En s'adsorbant, il confère de nouvelles propriétés à l'interface. Les tensioactifs peuvent être classés en fonction de leur nature : ainsi nous trouvons les tensioactifs anioniques, cationiques, neutres et amphotères selon la charge du pôle hydrophile[27].

1.6.4.2 Polymères

Les polymères ont des capacités à s'adsorber et à stabiliser l'interface d'une émulsion vis-à-vis des mécanismes de floculation et de coalescence. Il convient en général de choisir un polymère possédant des portions hydrophiles et des portions lipophiles. Le rapprochement des gouttelettes sera alors principalement freiné par l'encombrement stérique. L'inconvénient que peut présenter l'emploi de polymères trop long est de ponter plusieurs gouttelettes en provocant une floculation. Cependant, les polymères hydrosolubles peuvent stabiliser une émulsion H/E concentrée en inhibant le phénomène de coalescence[28].

1.6.4.3 Cristaux liquides

La stabilisation d'émulsions par des cristaux liquides est aussi une stabilisation d'origine stérique. Des cristaux liquides en s'accumulant à l'interface créent une barrière qui inhibe de manière importante le phénomène de coalescence[29].

1.6.4.4 Solides divisés

De fines particules solides adsorbées à l'interface eau/huile peuvent permettre la stabilisation des émulsions. Les particules solides exigent une certaine extension de l'interface. Lorsque la coalescence se produit, l'interface est réduite et les particules solides se densifient. A densité maximale, la coalescence ne peut plus se faire. Une réduction supplémentaire de l'interface exigerait en effet d'en retirer des particules solides, ce qui est une opération énergétiquement défavorable[30].

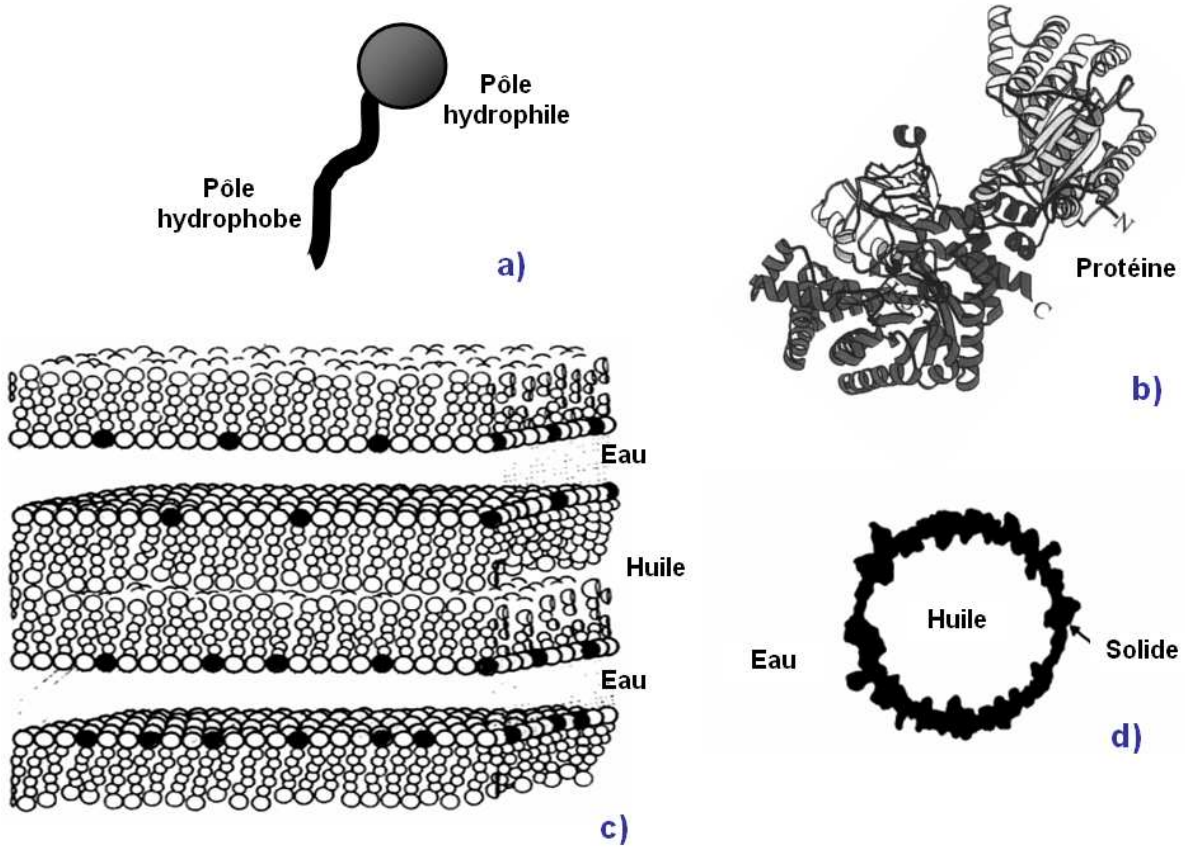


Figure 7 : Schéma illustratif des structures ou des organisations des différents agents émulsifiants : a) tensioactif, b) polymère, c) cristal liquide et d) solide divisé

Il est important de faire remarquer que le tensioactif et le polymère sont des molécules de petite et grande taille respectivement, tandis que le cristal liquide est un système d'assemblage et le solide divisé d'un état morphologique (Figure 7).

1.6.5 Stabilité d'une Emulsion

Comme les systèmes émulsionnés ne sont pas thermodynamiquement stables, il faut s'attendre à une démixtion. La stabilité cinétique d'une émulsion dépend aussi de plusieurs facteurs, comme par exemple la taille des gouttelettes, la différence entre les densités des phases, la nature et l'efficacité de l'émulsifiant, la viscosité de la phase continue, la température, l'agitation, les conditions de stockage.

Quand une émulsion se déstabilise, elle présente des phénomènes physiques qui regroupent le liquide précédemment dispersé. Ce sont les phénomènes de floculation, de coalescence et de sédimentation ou crémage (Figure 8).

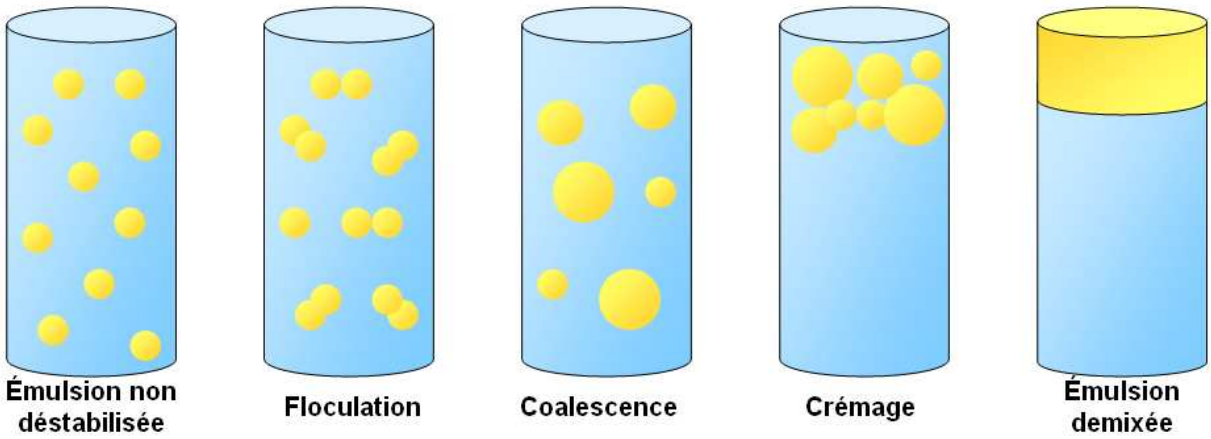


Figure 8 : Illustration des mécanismes de déstabilisation de l'émulsion

1.6.5.1 La Floculation

La floculation correspond à l'agrégation des gouttelettes suite à des collisions. Celles-ci peuvent être dues au mouvement brownien ou gravitationnel. La floculation interviendra alors sous l'effet de forces d'interactions attractives. Ces forces sont généralement de type Van der Waals et d'interactions hydrophobes. Ces dernières, moins souvent prises en compte peuvent cependant être fortes et de longue portée. Ainsi, les émulsions stabilisées par les

protéines possèdent souvent des groupes non polaires exposés au niveau de la phase aqueuse, apportant ainsi des interactions importantes[31].

La floculation est un état stable ou métastable et peut donc être réversible ou permanente. D'après la théorie DLVO (développée par Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek)[31], lorsque deux gouttelettes se rapprochent, les interactions attractives prédominent et nous pouvons nous trouver dans un puits énergétique peu profond, appelé minimum secondaire (Figure 9). Si ce minimum est plus important que l'énergie thermique (kT), les gouttelettes auront tendance à floculer. Cependant, une agitation du milieu ou une légère augmentation de la température permettra de les séparer de nouveau. Pour que les gouttelettes se rapprochent davantage, elles doivent surmonter les forces d'interactions répulsives (principalement électrostatiques) qui dominent à plus faible séparation. Si ces forces sont faibles, ainsi, si le potentiel électrocinétique des gouttelettes est bas (surfaces non chargées donc potentiel zêta faible), les gouttelettes surmonteront facilement la barrière énergétique et tomberont dans un profond minimum énergétique, amenant ainsi une forte floculation, irréversible. Cette dernière floculation amènera à la coalescence si les forces d'interaction stériques ne sont pas suffisantes.

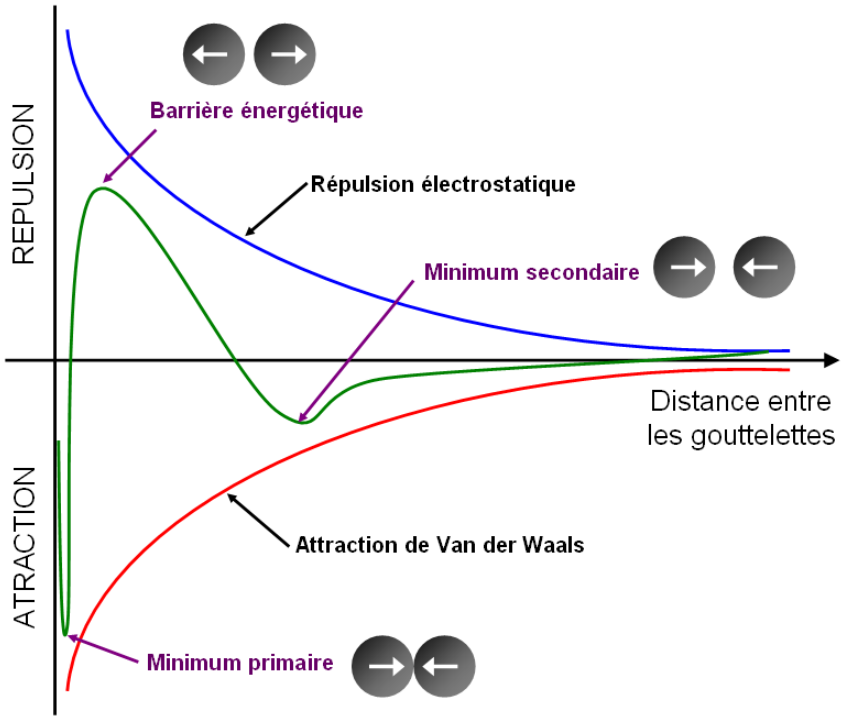


Figure 9 : Potentiel d'interaction pour une émulsion selon la théorie DLVO

1.6.5.2 La Coalescence

La coalescence est le processus qui conduit à la fusion de plusieurs gouttelettes de la phase dispersée. Elle permet de minimiser la surface dispersée et donc l'énergie du système, amenant alors un état plus stable. Ce phénomène suit généralement la floculation. Deux gouttelettes agrégées vont généralement se déformer en s'aplatissant. La coalescence est le processus inverse de l'émulsification, où deux ou plusieurs gouttelettes vont fusionner pour former une gouttelette plus grosse. Ce processus se répète pour revenir au système diphasique de départ. Ce phénomène est spontané selon l'énergie libre de Gibbs, puisque une réduction de l'aire superficielle rend cette énergie libre négative.

$$\Delta G = \gamma \Delta A - T\Delta S$$

La pression est plus forte entre les films qu'au niveau de la courbure, ce qui entraîne un drainage (Figure 10). Lorsque la différence de pression (pression de disjonction) $\pi(h)$ est négative, nous avons une attraction conduisant à la coalescence. Cette pression de disjonction est définie comme :

$$\Pi(h) = P(h) - P_d$$

où :

P(h) est la pression entre les films interfaciaux

P_d est la pression de la goutte.

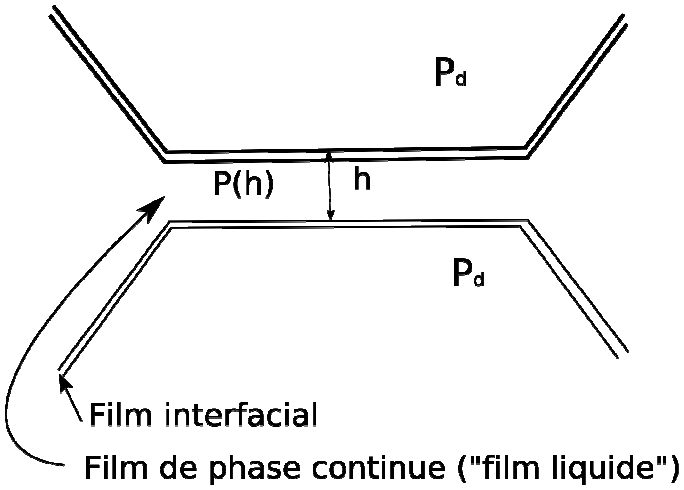


Figure 10 : Distribution des pressions lors de la coalescence

Plusieurs interprétations de cette dernière étape existent. Selon Scheludko[32], la rupture du film donnant lieu à la coalescence est généralement due à des fluctuations mécaniques et thermiques de ce dernier. En dessous d'une certaine distance inter-films, la fluctuation s'amplifie et la rupture du film est effective. Cette épaisseur critique est inversement proportionnelle à la tension interfaciale. Ainsi, plus cette tension est faible, plus l'épaisseur critique sera grande et les fluctuations importantes. Cependant, d'après cette théorie, l'épaisseur critique tend vers l'infinie lorsque la tension interfaciale tend vers zéro or cela n'est pas ce qui observé expérimentalement.

La coalescence peut généralement être prévenue par une gêne stérique importante, notamment avec des polymères adsorbés, qui empêche les gouttelettes de se rapprocher suffisamment. Dans ce cas, le solvant aura alors une grande importance en jouant notamment sur le comportement du polymère en solution. Un bon solvant conduira à une interpénétration difficile des polymères avec un effet répulsif tandis qu'un mauvais solvant amènera une interpénétration facile.

1.6.5.3 Le Crémage ou sédimentation

Le crémage ou la sédimentation résultent de l'application des forces gravitationnelles sur les gouttelettes. Ainsi, sur des gouttelettes dont le mouvement brownien ne compense pas les effets gravitationnels, on peut caractériser la vitesse de crémage ou sédimentation par la loi de Stokes :

$$V=\frac{2r^2 g(\rho_{huile}-\rho_{eau})}{9\eta_0}$$

où r est le rayon des gouttelettes (en m), g l'accélération de la pesanteur (en m/s²), ρ est la densité (en kg/m^3) et η_0 est la viscosité de la phase continue (en Pa·s : kg·m^{-1}·s^{-1})

Nous voyons bien que plus la taille des gouttelettes augmente, plus cette vitesse de crémage ou de sédimentation est importante. Dans le cas de l'émulsion huile dans eau, les gouttelettes vont peu à peu migrer vers la surface de la solution sous l'effet de la gravité. Il s'agit du crémage. La sédimentation est le phénomène inverse, observable par exemple dans l'émulsion eau dans huile. L'eau ayant une densité plus importante les gouttelettes vont

migrer vers le bas de la solution. Ce phénomène, comme nous le voyons peut aussi être minimisé en réduisant la différence de densité entre les deux phases ou en augmentant la viscosité du milieu car ceci diminue le mouvement des gouttelettes à travers la phase continue.

1.6.6 Caractérisation des Emulsions

Après avoir préparé une émulsion, il est nécessaire de la caractériser pour connaître ses propriétés physico-chimiques et ainsi évaluer sa qualité et sa stabilité. Voici les paramètres à prendre en compte.

1.6.6.1 Type d'émulsion

Les techniques utilisées pour savoir quel type d'émulsion a été formé sont diverses :

- Une simple dilution peut nous dire quelle est la phase continue, car nous savons qu'elle sera diluée seulement dans le même liquide que celui qui forme la phase continue.
- Un test de coloration spécifique et déterminer la nature du milieu externe.
- Une mesure de conductivité peut aussi donner cette information, car la conductivité de l'émulsion sera apportée principalement par la phase continue.
- Dans le cas des huiles qui présentent une fluorescence sous la lumière UV, un test de fluorescence semble pertinent.

1.6.6.2 Taille de gouttelette

Une caractéristique fondamentale dans les émulsions est la taille de gouttelette. C'est un paramètre qui donne des informations sur la stabilité de l'émulsion, car plus la taille est petite, plus l'émulsion est stable. Pour la mesurer, deux techniques sont très utilisées :

- **Observation Microscopique :** Elle permet d'observer directement l'homogénéité de l'émulsion, de constater les possibles agglomérats ou coalescences. Pour déterminer la taille de gouttelettes des logiciels sont couplés pour le traitement d'images. Les inconvénients de cette technique sont les possibles effets optiques occasionnés par un

milieu très concentré, l'introduction d'air dans le milieu, la superposition de plans ou l'écrasement de gouttelettes entre les lamelles. Les limites d'observations sont reliées à la résolution maximale du microscope.

- **Granulométrie Laser :** Elle est basée sur le principe de la diffraction/diffusion de la lumière. Les particules en suspension diffractent la lumière émise par un faisceau laser. La répartition spatiale de cette lumière, fonction de la taille des particules, est enregistrée par un ensemble de photodiodes. L'analyse de cette distribution dans le plan focal permet de déterminer la proportion de chaque classe dimensionnelle. L'inconvénient réside dans le résultat obtenu qui est la réponse à un signal, ainsi il est impossible de savoir si la mesure effectuée correspond à la taille d'agrégats ou de particules individuelles. La gamme de tailles mesurées va de 0,6 nm à plusieurs millimètres.

Il existe une autre méthodologie qui n'est pas très utilisée de par sa complexité, mais qui peut être très utile en présence de certains systèmes. Il s'agit de l'analyse calorimétrique différentielle (DSC). Elle peut être utilisée pour caractériser des émulsions E/H opaques et concentrées issues de l'industrie pétrolière. Cette technique peut donner des informations sur le type d'émulsion, la quantité d'eau, la présence de soluté, la stabilité et même la taille des gouttelettes[33].

1.6.6.3 Stabilité Physique

Comme nous l'avons déjà dit, la stabilité d'une émulsion est fonction de plusieurs paramètres. Les mesures de stabilité physique consistent donc à modifier ces paramètres de façon à perturber l'état « statique » de celle-ci et mesurer sa « non-stabilité ». Ceci a pour but d'accélérer le processus de séparation naturel d'une émulsion, pour avoir des résultats dans des délais plus courts. Nous allons citer quelques exemples :

- **Turbidité :** Cette technique consiste à faire des mesures au cours du temps de la turbidité d'une émulsion. Des changements significatifs dans la valeur signifieront qu'il y a eu un fractionnement du milieu. L'inconvénient de cette technique avec des systèmes traditionnels c'est que la mesure est faite pour un seul point, donc si la séparation n'est pas très importante l'effet ne s'observera pas. Pour cela il existe un dispositif plus sophistiqué appelé Turbiscan, qui réalise des mesures de turbidité tout

au long du tube qui contient l'échantillon[34].

- **Centrifugation :** Cette opération permet d'accélérer le crémage ou la sédimentation d'une émulsion. D'après l'équation de Stokes, la vitesse de ces phénomènes est proportionnelle à l'accélération gravitationnelle appliquée. Ainsi, à la fin d'une centrifugation, nous observerons un degré de séparation du milieu émulsionné d'autant plus important que le temps et l'accélération auront été suffisamment importants. Le type de résultat que cela permet d'obtenir est une estimation de la stabilité d'une émulsion au cours du temps. Il existe un dispositif commercial appelé Lumifuge, qui fait des mesures de transmission de la lumière à travers toute la hauteur d'un tube contenant une émulsion au cours de sa centrifugation et trace ainsi un profil de séparation en fonction du temps.
- **Traitement thermique :** Des changements importants en température peuvent avoir de fortes influences sur la stabilité d'une émulsion. Ils peuvent avoir un effet sur le pouvoir d'un agent émulsifiant (soit par une modification de sa solubilité, dégradation ou modification de conformation) ou même un effet sur la miscibilité des liquides. Un exemple est un cycle gel-fusion qui produit un choc thermique (congélation suivie d'un échauffement) qui peut être suivi d'une centrifugation mettant ainsi en évidence la séparation due à ce cycle de traitement thermique. Cette méthode est en général utilisée pour déterminer la résistance à la coalescence d'une émulsion. L'émulsion présentera ainsi une séparation des phases totale ou partielle si elle ne supporte pas le cycle, ce qui peut être interprété comme un critère d'instabilité[35]. Si la centrifugation a lieu, un témoin est nécessaire pour observer l'influence de la centrifugation seule sur la séparation du milieu.
- **Potentiel Zêta :** La variation du potentiel électrique aux abords d'une surface peut être modélisée dans le cas des émulsions par le modèle de la double couche de Gouy-Chapman[36]. Une couche d'ions est adsorbée à la surface. En s'éloignant de la surface le potentiel décroît exponentiellement à cause d'une couche de contre-ions de la solution, adsorbés eux-mêmes à la surface. L'espace inter-gouttelettes est un espace diffus d'ions. En contact avec la solution, la surface des gouttelettes se charge à cause de la dissociation des molécules adsorbées. Cette dissociation est directement liée aux espèces présentes en solution, au pH et à la force ionique. Le potentiel zêta peut être assimilé à la valeur du potentiel électrique à la limite de la couche rigide ou couche externe de Stern (Figure 11). Il caractérise donc la répartition des charges électriques sur la surface.

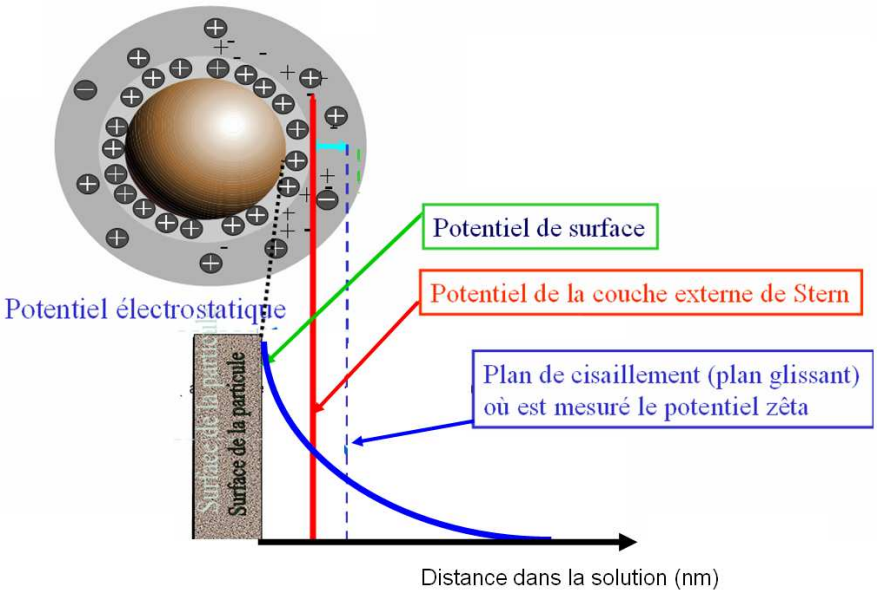


Figure 11 : Représentation de l'évolution du potentiel électrostatique en fonction de la distance entre la surface et la solution

1.6.7 Emulsions comme lubrifiants

Parmi tous les systèmes émulsionnés, nous allons nous intéresser au plus connu de tous : l'émulsion directe où la phase huile est dispersée dans un milieu aqueux. En effet, dans le domaine de la lubrification c'est ce type de conformation qui sera principalement employé pour l'usinage de métaux. L'eau permettra l'échange de chaleur nécessaire pour refroidir le procédé, pendant que le milieu dispersé exhibera son pouvoir lubrifiant à la surface des pièces traitées.

Ces fluides d'usinage de métaux présentent généralement des risques pour l'environnement. Ils peuvent contaminer l'air par des brouillards d'huile, des fumées et des émanations gazeuses et polluer les sols et les nappes phréatiques par les liquides déversés. De même, les composants actuels représentent aussi des risques pour la santé humaine lors de l'utilisation, comme la présence de chlore, bore et d'autres additifs dans ces produits. Il est donc important de pouvoir utiliser des ressources renouvelables non toxiques.

Nous trouvons ainsi des formulations de fluides pour l'usinage des métaux où les bases d'huile minérale ont été substituées par des bases synthétiques à partir d'huiles

végétales, ou tout du moins dont les additifs sont issus des ressources renouvelables. Les exemples que nous allons citer ci-dessous sont des formulations déjà brevetées. Un exemple est l'emploi d'une émulsion d'huile minérale et d'eau réalisée avec de l'acide carboxylique, des esters de ce même acide et des agents émulsifiants[37]. Un autre exemple est la substitution d'huile minérale par des acides gras entre 12 et 18 atomes de carbone dans un alcool polyoxyalkylène miscible dans l'eau avec une alcanolamine et la possibilité d'ajouter des esters d'acide carboxylique[38]. L'utilisation de mélanges d'eau avec des esters formés par transestérification d'un glycol poxyalkylène et d'un acide carboxylique de grande masse moléculaire peut ainsi être utilisé comme fluide d'usinage des métaux[39].

Dans le cadre du projet IBIOLAB, nous voulons aller plus loin en diminuant les étapes du procédé et en valorisant divers systèmes organisés constitués des molécules d'intérêt. C'est ainsi que nous voulons former des émulsions directes à partir des oléosomes, sources d'huile végétale et d'agents émulsifiants naturels, en veillant à l'impact environnemental de chaque étape. C'est ainsi que nous présenterons d'abord la structure de l'oléosome qui sera ensuite utilisé comme matière première structurée pour créer des émulsions H/E.

1.7 Oléosome

Les lipides, molécules servant de réserves énergétiques pour la plupart des organismes vivants, sont stockés à l'intérieur de ces derniers en attendant leur emploi. Dans le cas particulier des graines oléoprotéagineuses, ils forment des structures organisées et régulières appelées oléosomes[40]. Ces structures sont constituées de gouttelettes de lipides entourées d'agents émulsifiants naturels qui sont principalement des phospholipides et des protéines spécifiques appelées oléosines. Phospholipides et oléosines possèdent un caractère amphiphile qui leur confèrent la propriété de se situer facilement à l'interface huile/eau[41].

Les oléosomes présentent normalement une conformation sphérique avec une taille moyenne qui oscille entre 0,2 et 2,5 µm en fonction de la nature de la graine et de facteurs nutritionnels et environnementaux. Ceci s'explique par l'intérêt qu'a la graine en premier lieu à isoler et protéger ces lipides du reste des constituants en formant des structures sphériques qui offrent le rapport surface/volume le plus faible et en les entourant d'une membrane ; et en deuxième lieu à augmenter la surface totale offerte par les lipides pour augmenter l'action des

enzymes lors de l'utilisation de ces réserves. En plus, le fait d'avoir des petites structures protégées par une membrane prévient la coalescence qui exposerait les lipides à un contact massif avec les lipases endogènes.

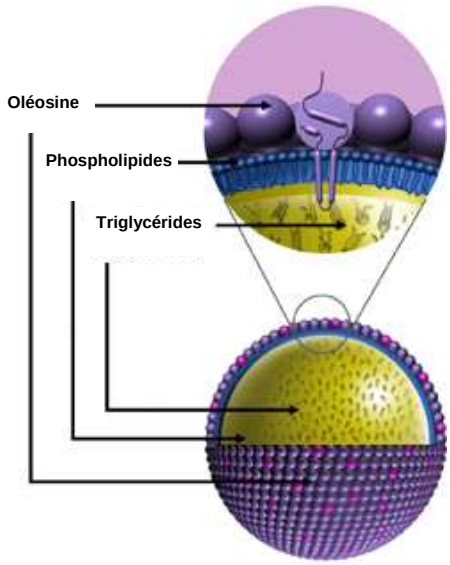


Figure 12 : Structure d'un oléosome[42]

Dans la Figure 12 la structure d'un oléosome est présentée. Nous remarquons comment les phospholipides forment une monocouche autour des lipides. Les oléosines, molécules d'une taille beaucoup plus importante, s'insèrent dans cette membrane en exposant leurs régions hydrophobes dans la phase lipidique et leur partie hydrophile à l'extérieur de la structure.

Les oléosomes sont des structures très stables qui résistent bien aux changements thermiques comme à l'attaque de détergents[43]. Cette stabilité est principalement apportée par les agents émulsifiants. L'encombrement stérique est assuré dans notre cas par les oléosines, et la charge surfacique par les phospholipides (tensioactifs anioniques)[44]. Les points isoélectriques d'oléosomes sont compris entre 5,7 et 6,6 en fonction des espèces[45].

1.7.1 Oléosines

Les oléosines sont des protéines alcalines qui ont une taille moléculaire qui va de 15 à 26 kDa en fonction des espèces, et des isoformes présentes[46]. Elles comprennent trois

domaines : un domaine central hydrophobe avec un feuillet β prédominant, composé de 70 acides aminés[47]. Ce domaine est entouré de régions polaires dans les parties N et C terminales, comprenant respectivement environ 60 et 50 acides aminés et constituées d'hélices α[48], lesquelles peuvent être situés à l'interface huile/eau[49]. Ces domaines sont arrangés de telle façon que les charges positives des acides aminés soient présentées coté lipides et celles négatives coté aqueux[44] de l'interface.

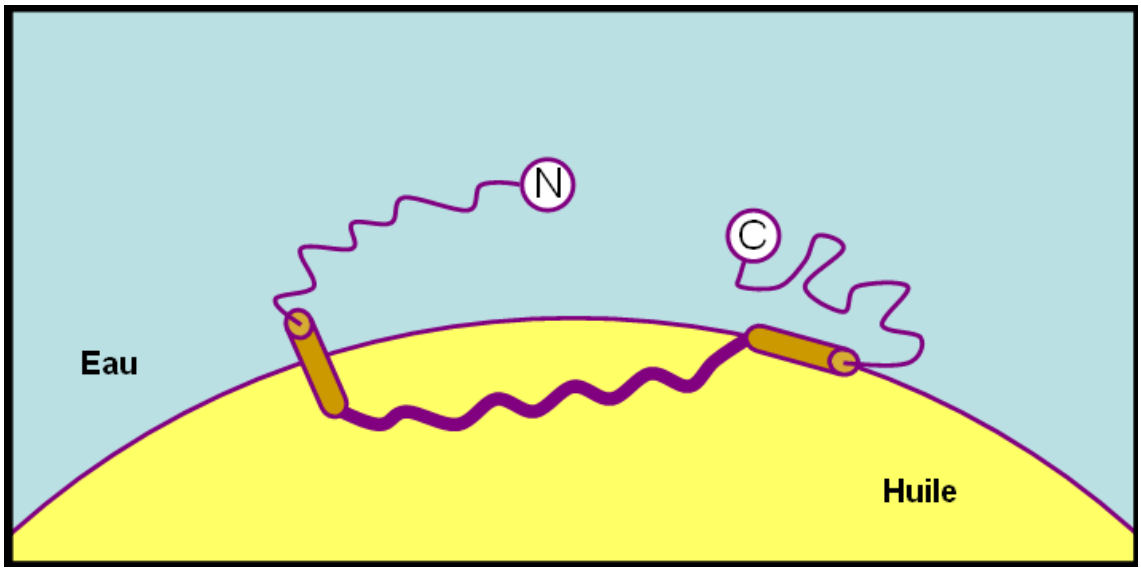


Figure 13 : Conformation d'une oléosine à la surface du corps lipidique[49]

Les protéines, d'une façon générale, sont des longues chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Parmi toute la famille des acides aminés, certains possèdent un caractère hydrophobe alors d'autres sont hydrophiles. L'affinité d'une protéine pour une gouttelette d'huile sera reliée à la nature de ses acides aminés tout comme à sa configuration tridimensionnelle (Figure 13).

Les protéines ne diminuent pas généralement de façon significative la tension interfaciale. Quand elles sont adsorbées sur une gouttelette d'huile, de par leur taille, elles saturent la surface à une concentration molaire beaucoup moins importante que d'autres tensioactifs. Elles peuvent former un réseau qui fonctionne comme barrière contre la coalescence mais qui peut aussi avoir un effet important sur l'attraction ou la répulsion entre gouttelettes. Ainsi, les interactions principales entre les protéines qui entourent les corps lipidiques sont de nature électrostatique et/ou stérique[44].

Un acide aminé peut être ionisé avec l'action du pH. Une protéine, qui est un polymère d'acides aminés, est normalement chargée. Ainsi, à un pH donné, la macromolécule possédera une charge globale ou nette, et nous définirons le point isoélectrique d'une protéine comme le pH pour lequel cette charge nette est égale à zéro. La solubilité dans l'eau de cette protéine à ce pH n'est plus une conséquence de ses parties hydrophobes et hydrophiles. Généralement nous pouvons solubiliser une protéine dans l'eau si le milieu a un pH éloigné du point isoélectrique.

Quand l'oléosine est adsorbée sur un oléosome, la partie externe de la protéine présente une charge qui dépend du pH du milieu externe. Loin du point isoélectrique, la charge nette de la surface peut être assez importante pour présenter une répulsion électrostatique. Dans le cas contraire, au point isoélectrique, les forces de répulsion seront largement diminuées et les forces attractives seront prépondérantes.

1.7.2 Phospholipides

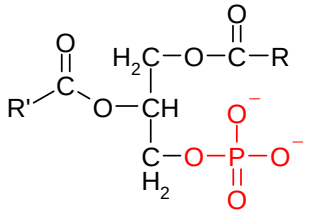
Les phospholipides sont des lipides possédant un groupe phosphate. Il existe deux grandes classes de phospholipides (Figure 14)[50] :

- La première concerne ceux qui ont deux acides gras et un acide phosphate assemblés à une molécule de glycérol.
- La deuxième concerne les phospholipides composés d'un acide gras et un acide phosphate liés à une molécule de sphingosine (sérine associée à un acide gras).

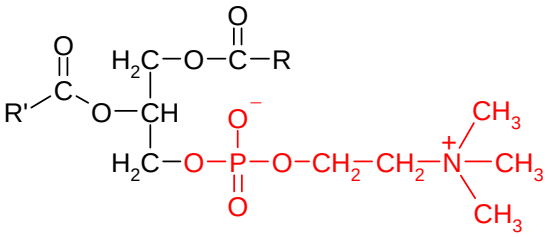
Parmi ces derniers nous trouvons la sphingomyéline qui représente le lipide majoritaire dans certaines membranes animales, mais qui est moins important dans le monde végétal ou bactérien.

La particularité des phospholipides est qu'ils sont constitués à la fois par un groupe polaire (tête hydrophile) et non-polaire (queue hydrophobe). Ceci lui confère un caractère amphiphile qui lui permet d'adopter différentes structures. C'est ce qu'on appelle le polymorphisme lipidique. Nous trouvons ainsi la structure lamellaire en présence d'eau, ou la phase hexagonale (H_{II}) en présence d'un milieu organique (Figure 15). En plus, ces molécules

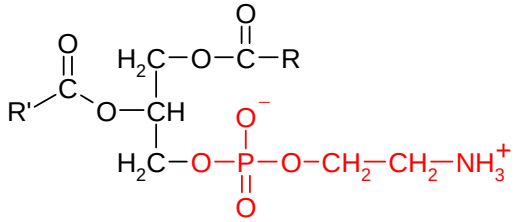
ont des charges au niveau de la tête hydrophile, ce qui fait d'elles des tensioactifs avec un caractère ionique voire amphotère.



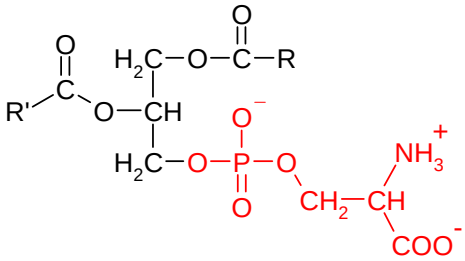
Acide phosphatidique (PA)



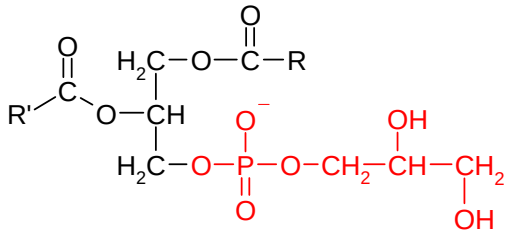
Phosphatidylcholine (PC)



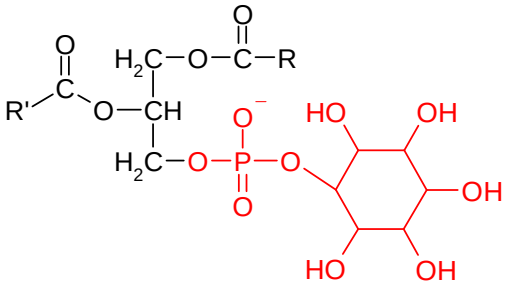
Phosphatidylethanolamine (PE)



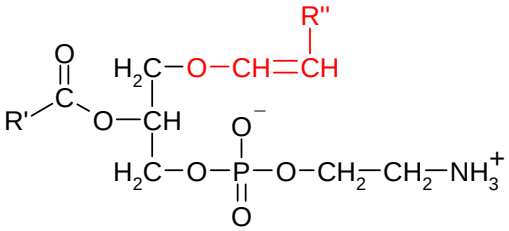
Phosphatidylserine (PS)



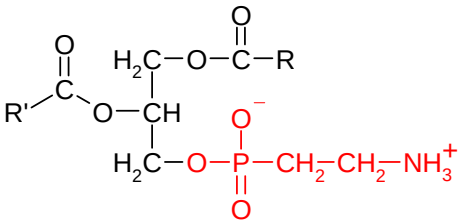
Phosphatidylglycérol (PG)



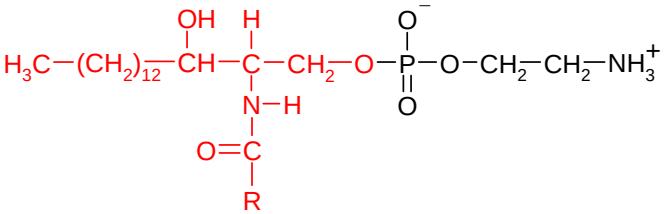
Phosphatidylinositol (PI)



Plasmalogène



Phosphonolipide



Sphingomyéline

Figure 14 : Structure des phospholipides. En couleur rouge les parties qui différencient chaque molécule

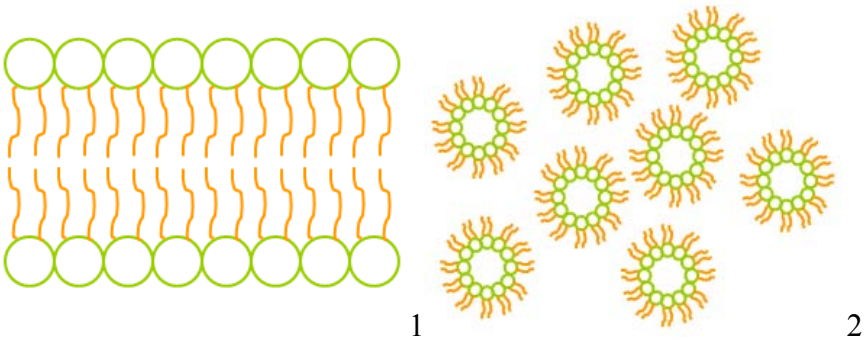


Figure 15 : Structures mésophormes adoptées par les phospholipides : 1. Lamellaire et 2. hexagonale II

Ces configurations sont fonction de la nature du phospholipide. PC, PS, PG, PI et PA ont une préférence pour la structure lamellaire, PE et PS et PA à pH inférieur à 3, ont une préférence pour l'hexagonale II[50].

Comme cela a été précédemment explicité, les phospholipides ont une préférence pour la structure lamellaire dans les milieux aqueux, pour former des micelles, des liposomes et des bicouches lipidiques (Figure 16).

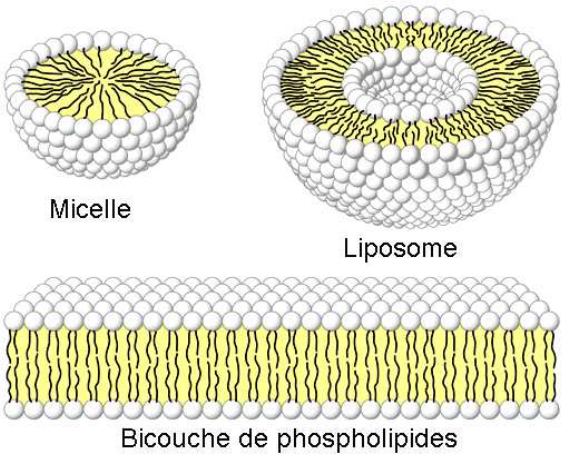


Figure 16 : Structures adoptées par les phospholipides en milieux aqueux

Les phospholipides, avec les protéines, forment ainsi les membranes biologiques. La fonction de ces lipides est d'offrir une barrière perméable pour le contrôle des transferts de masse entre le milieu interne et externe. Dans le cas des oléosomes, les phospholipides forment une « semi membrane » qui protège le corps lipidique. Nous comprenons comme « semi membrane » le fait que les phospholipides forment une monocouche qui expose les têtes hydrophiles à la surface.

Le pouvoir émulsifiant des phospholipides est largement exploité dans l'industrie alimentaire, c'est particulièrement le cas de la phosphatidylcholine, appelée aussi lécithine. Dans le cas des oléosines, leur potentiel à être employées comme agents émulsifiants a été montré par Harada *et coll.*[51]. Dans le cas des oléosomes, ces deux types de molécules apportent de la stabilité aux structures lipidiques. Il existe des travaux de recherche qui essaient d'expliquer ce mécanisme de stabilisation et de trouver de possibles interactions entre ces deux molécules à l'interface. Tzen et Huang ont montré dans des reconstitutions d'oléosomes de maïs, que la présence des deux molécules est nécessaire pour l'obtention de structures stables[52]. Li *et coll.* sont arrivés aux mêmes conclusions pour les reconstitutions d'oléosomes de colza[47].

Dans une caractérisation plus poussée des oléosines à l'interface, les travaux de Roux *et coll.* ont montré le besoin d'une monocouche de phospholipides pour que les oléosines puissent s'insérer à l'interface[53]. Cependant, ces travaux n'ont pas montré de différence évidente d'interaction entre des oléosines et différents phospholipides, ni de différences entre les isoformes d'oléosines. Nous y attacherons une attention particulière quant à la synergie d'actions des phospholipides et des oléosines natives au bénéfice de la stabilité des émulsions engendrées à partir des lipides endogènes des graines oléoprotéagineuses.

1.8 Graines oléoprotéagineuses

Parmi les ressources renouvelables qui peuvent nous fournir des huiles sous la forme d'oléosomes, nous trouvons les graines oléoprotéagineuses. Ce sont des graines dont les constituants majeurs sont, comme leur nom l'indique, des lipides et des protéines. Elles sont cultivées notamment pour la production d'huile, mais parfois ce sont d'autres composants qui sont valorisés. C'est le cas du soja qui fournit les phospholipides tels que la lécithine, et les protéines pour l'alimentation animale et humaine ; ou le cas du coton ou du lin dans lequel leurs fibres sont destinées à la filière textile.

Tableau 3 : Taille et composition massique d'oléosomes isolés à partir de différentes graines[45]

Graine	Colza	Lin	Moutarde	Coton	Maïs	Arachide	Sésame
Diamètre (µm)	0,65	1,34	0,73	0,97	1,45	1,95	2,00
Lipides neutres (%)	94,21	97,65	94,64	96,99	97,58	98,17	97,37
Protéines (%)	3,46	1,34	3,25	1,70	1,43	0,94	0,59
Phospholipides (%)	1,97	0,90	1,60	1,18	0,91	0,80	0,57
Acides gras libres (%)	0,36	0,11	0,17	0,13	0,09	0,09	0,13

Tzen *et coll.*[45] ont étudié la composition des oléosomes isolés à partir de différentes graines (Tableau 3). Les lipides neutres, essentiellement des triglycérides, représentent plus de 94 % de la masse d'un oléosome alors que les teneurs en phospholipides et protéines varient respectivement de 0,4 à 2 % et de 0,5 à 4 %. Nous constatons que la taille des oléosomes varie en fonction de la nature de l'espèce, mais aussi que la baisse du pourcentage en protéines et phospholipides est reliée à une augmentation dans la taille de l'oléosome.

Le profil des lipides varie aussi en fonction de la nature de la graine voire de la variété au sein d'une même espèce. Nous trouvons ainsi des graines plus riches en certains acides gras ou des graines possédant des acides gras spécifiques. Le Tableau 4 montre le profil en acides gras des lipides issus de différentes graines.

Tableau 4 : Profil en acides gras des lipides des différentes graines (pourcentage massique)[54]

Acide gras	Colza*	Tournesol*	Tournesol HO	Tournesol très HO	Soja*	Lin*
Acide Palmitique C16:0	4	7	4	4	10	7
Acide Stéarique C18:0	2	5	6	2	4	4
Acide Oléique C18:1 n9	56	24	85	88	21	20
Acide Linoléique C18:2n6	21	63	5	5	56	17
Acide Linolénique C18:3n3	10	0	0	0	8	52

HO : Hautement Oléique
* Traditionnel

Nous pouvons observer des différences plus ou moins importantes dans les profils en acides gras des lipides des différentes espèces. Cependant, l'acide oléique est majoritaire chez le colza et chez les deux variétés de tournesol hautement oléique, tandis que le linoléique est majoritaire chez le soja et le tournesol classique et le linolénique chez le lin. Il est important de constater qu'il y a aussi des différences parmi les variétés de tournesol. En effet, ces

variétés sont développées de façon à améliorer la stabilité à l'oxydation de l'huile en augmentant la teneur en acide oléique par rapport à l'acide linoléique.

Tableau 5 : Composition en pourcentage massique des phospholipides isolés dans les oléosomes de différentes graines

PL	Tournesol[55]	Soja[45]	Colza[45]	Lin[45]	Moutarde[45]	Coton[45]	Maïs[45]	Arachide[45]	Sésame[45]
PC	79	57,1	59,9	57,2	53,1	58,9	64,1	61,6	41,2
PE	13	13,5	5,9	2,8	15,5	4,6	8,1	5,0	15,8
PI	8	15,6	14,0	6,9	13,1	18,1	7,6	8,4	20,9
PG	-	3,4	-	-	-	-	-	-	-
PS	-	-	20,2	33,1	18,3	18,7	20,2	25,0	22,1

De la même façon que le profil en acides gras varie en fonction de la graine, la composition des phospholipides dans les oléosomes de différentes graines varie également. Le type de phospholipides ainsi que leur répartition quantitative dans les oléosomes de différentes espèces sont indiqués dans le Tableau 5. La PC est le phospholipide majeur dans les corps lipidiques alors que la PE, le PI, le PG et la PS sont toujours mineurs et dans des proportions assez distinctes dans les oléosomes de chaque espèce[45, 55, 56].

1.9 Libération d'oléosomes

La présence des oléosomes à l'intérieur de la graine impose une transformation mécanique qui puisse permettre leur libération de cette matrice. Nous ne pouvons pas utiliser les procédés employés dans l'industrie pour l'obtention d'huile à partir des graines, car ceux-ci impliquent des étapes assez agressives et destructives auxquelles les oléosomes ne résistent pas. Pour cela la conception d'une nouvelle méthodologie a été envisagée dans le cadre de cette thèse.

L'implémentation d'un procédé qui permet de créer des émulsions « natives » à partir d'oléosines de la graine représente d'énormes avantages dans le cadre d'un développement durable. En effet, la voie classique pour l'obtention d'émulsions implique toute une série de procédés, qui vont de la production et/ou purification des constituants jusqu'à la formation de l'émulsion ; sans prendre en considération les contraintes auxquelles certaines formulations sont soumises dues à la présence de certains produits qui font objet des réglementations

auparavant présentées.

Pour tout cela, nous proposons le développement d'un procédé qui soit respectueux de l'environnement et respecte les principes de la chimie verte, c'est-à-dire, un procédé qui limite les intrants comme les étapes énergivores, qui travaille à des températures douces et surtout qui utilise des ressources renouvelables.

1.9.1 Travaux précédents sur l'isolement d'oléosomes

Les travaux de recherche sur la caractérisation des oléosomes ont nécessité le développement de méthodes pour isoler ces structures. Cependant cela est réalisé en plusieurs étapes et reste à une petite échelle.

White *et coll.*[57] ont envisagé pour la première fois la création d'une émulsion native constituée d'oléosomes de tournesol. Iwanaga *et coll.*[58] ont aussi prévu l'emploi d'oléosomes de soja comme bases émulsifiées pour l'industrie alimentaire. Guth *et coll.*[40] de leur côté ont imaginé l'exploitation d'oléosomes de carthame pour la création d'émulsions directes stables dans la filière cosmétique. Tandis que Boucher[59] a employé des oléosomes de colza comme agent floculant pour des métaux dans des eaux contaminées.

Dans le cas des travaux de thèse de Mechling, la formation d'un milieu émulsionné est recherchée lors de l'extraction aqueuse, car la transformation enzymatique *in situ* sur les triglycérides de la graine est favorisée dans un milieu émulsionné[60, 61]. Ce sont ces travaux qui ont inspiré cette thèse, notamment les outils de transformation que nous appelons « Procédé Intégré ».

1.9.2 Le Procédé Intégré

Le procédé intégré a pour objectif le bioraffinage de la graine en fractionnant ses constituants selon les différentes affinités qu'ils peuvent présenter avec l'eau tout au long du procédé. Même si toutes les fractions générées lors du procédé peuvent être valorisées, nous allons nous intéresser plus particulièrement à la fraction émulsionnée enrichie en oléosomes. L'originalité de cette démarche réside dans la production directe d'émulsions avec les

composants déjà présents et assemblés dans la graine : l'huile, les agents émulsifiants et l'eau ajoutée.

Ce développement intègre l'impact environnemental des procédés de transformation. Les traitements réalisés sur les graines oléoprotéagineuses et leurs dérivés dans ce procédé ne représentent pas un danger pour l'environnement car ils ne font pas appel à des produits toxiques.

Concrètement, le procédé intégré est une association d'actions chimiques, thermiques et mécaniques qui permettent la transformation de la graine. Il consiste en deux voire trois étapes, qui font intervenir différents outils permettant, au final, l'obtention de différentes fractions ou produits (Figure 17). Ces étapes seront décrites par la suite.

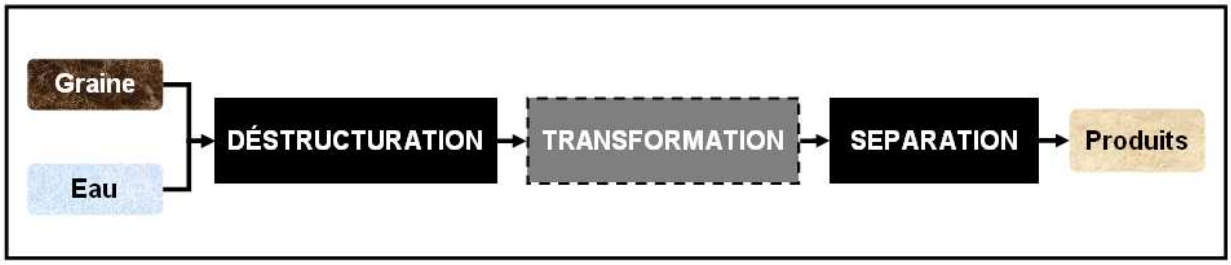


Figure 17 : Etapes du procédé intégré

1.9.2.1 Déstructuration

L'étape préliminaire est l'étape de déstructuration de la graine, qui permettra de libérer les corps lipidiques présents dans celle-ci. Nous remarquons, pour les procédés d'extraction aqueuse d'huile à partir de graines oléagineuses, que le broyage peut être humide ou à sec. Il est choisi en fonction de l'humidité, la composition chimique et la structure physique de la graine[62]. Dans le cas où les graines ont un taux d'humidité important, un broyage humide sera préférable pour éviter une étape d'échauffement nécessaire dans le broyage à sec. De même, un broyage humide est recommandé pour assouplir les parois cellulaires, ce qui facilitera leur rupture[63]. Par contre, le broyage à sec est conseillé dans les cas où la graine forme une émulsion stable avec l'eau, car l'objectif est d'extraire l'huile le plus facilement possible. Cependant, dans notre cas, cette émulsion stable est au contraire souhaitée.

Le fait de faire appel à un broyage humide apporte d'autres avantages, comme un bon écrasement de la graine de par une meilleure répartition des forces de coupe créées par les forces de cisaillement générées par l'outil mécanique. En plus, dans notre cas, utiliser un broyage sec impliquerait de toute façon une étape mécanique supplémentaire afin de mettre en contact les graines broyées avec l'eau pour libérer les oléosomes dans le milieu aqueux.

L'efficacité dans la libération d'oléosomes sera reliée à la performance du broyage, comme dans tous les procédés d'extraction d'huile, traduite par la réduction de taille des solides. Ainsi nous chercherons des technologies qui peuvent nous permettre de réduire la taille des particules des graines quelle que soit leur dimension initiale. Nous avons présenté dans la Section 1.6.3 (Tableau 2) des outils mécaniques pour former des émulsions. Parmi eux, nous trouvons des équipements qui sont également utilisés dans la déstructuration des solides. C'est le cas des agitateurs comme le rotor/stator, du moulin colloïdal et de l'homogénéisateur haute pression (Figure 18).

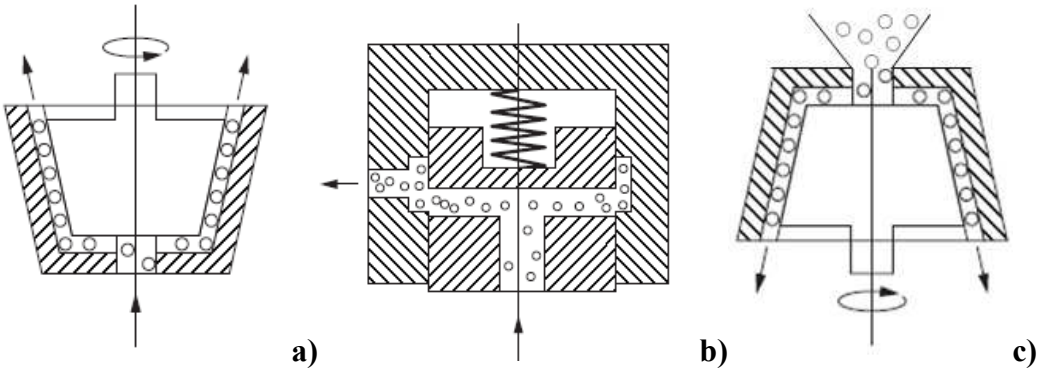


Figure 18 : Équipements d'émulsification et de déstructuration de solides : **a)** rotor/stator, **b)** homogénéisateur haute pression et c) moulin colloïdal[23]

1.9.2.2 Transformation

Il est possible d'ajouter une étape de transformation de l'huile au cours du procédé : une hydrolyse des triglycérides. Cette transformation sera réalisée à l'aide d'un catalyseur d'origine biologique, une enzyme, de façon à respecter les principes de la chimie verte. L'intérêt de cette transformation *in situ* est d'éviter d'autres étapes intermédiaires au cours du procédé, et aussi de profiter des étapes du procédé qui favoriseront cette réaction : les actions mécaniques augment en effet la mise en contact du substrat avec l'enzyme.

Comme cela a déjà été précisé plus haut, le développement de ce procédé intégré est né des travaux de thèse de Mechling. Ils avaient comme but la production d'acides gras issus d'une hydrolyse enzymatique grâce à la lipase issue de *Candida rugosa*. Cette enzyme a la particularité de présenter une bonne activité catalytique et une non-stéréoséléctivité[64]. De plus, sa structure tridimensionnelle adopte une conformation particulière qui la rend active en s'adsorbant aux interfaces huile/eau[65, 66]. Ainsi, travailler en milieu émulsifié constitue un avantage pour la réalisation de ce type de synthèse. Notons de même que l'enzyme *Candida rugosa* est également efficace pour catalyser la réaction d'estérification des acides gras avec des alcools[67].

En corollaire, les résultats des travaux de thèse de Mechling ont aboutit à l'obtention de milieux émulsionnés dans lesquels les acides gras sont organisés. Ils sont aptes aux usages directs ou à la transformation lipochimique *post-planta*.

1.9.2.3 Séparation

Après l'étape du broyage, nous aurons besoin de séparer les différents constituants de la graine et ainsi obtenir les différents produits valorisables du procédé. Pour cela, l'emploi d'une centrifugation, qui permettra de segmenter les constituants de la graine en fonction de leur densité, semble judicieux[62, 63].

Il est vrai qu'il existe d'autres opérations unitaires pour fractionner un milieu hétérogène, comme la filtration ou la simple décantation. La première est d'ailleurs largement utilisée dans les techniques de purification d'oléosomes[57]. Cependant, cela présente des inconvénients qui sont présentés ci-dessous :

- **Filtration :** L'inconvénient de cette technique est qu'avec des mélanges multiconstituants avec une teneur importante en constituants de grande taille, des colmatages apparaissent très vite, fait qui peut arrêter ou diminuer la fonctionnalité de l'opération au cours du temps.
- **Décantation :** Cette opération est certes peu coûteuse (faible consommation énergétique et équipement facile à agrandir son échelle), mais c'est une opération qui prend beaucoup du temps.

1.9.3 L'eau comme « solvant » ou milieu réactionnel

L'eau est un solvant non inflammable, non toxique et non COV, qui présente de plus une constante diélectrique très importante de $\varepsilon = 78{,}5$ à 25 °C. L'eau est donc un très bon solvant polaire. Il y a quelques dizaines d'années, il était étonnant d'envisager l'eau comme solvant pour la synthèse organique à cause de son incompatibilité avec les réactifs et/ou produits apolaires. Cependant, depuis que la science essaie de prendre comme modèle ce qui se passe dans la nature, avec tous les procédés biochimiques où l'eau est présente, cette idée commence à changer. Nous trouvons plusieurs exemples de synthèses organiques qui sont effectuées dans des milieux aqueux[68]. Des réactions de substitution nucléophile ou des réactions de Diels-Alder qui sont favorisées dans des solvants polaires, ont été effectuées en présence d'eau.

L'eau qui est mise en présence au moment du broyage des graines oléoprotéagineuses aidera à l'obtention de fines particules grâce à la diffusion des contraintes mécaniques et à la plus facile rupture des parois cellulaires suite à leur assouplissement. En plus, grâce à la capacité thermique massique importante de l'eau, cette dernière aura un rôle réfrigérant, dissipateur de chaleur lors du broyage, agissant comme un lubrifiant. Lors de cette déstructuration, les constituants de la graine seront en contact avec l'eau et présenteront différentes affinités pour celle-ci. Au moment du fractionnement, les constituants vont s'associer en fonction de leurs densités respectives. Comme dans toute extraction aqueuse des graines oléagineuses, l'obtention de trois phases est attendue :

- La phase moins dense, contiendra les lipides sous forme d'oléosomes en association avec les phospholipides et les oléosines.
- La phase la plus dense contiendra tout les débris cellulaires de la graine, qui n'ont pas été solubilisés dans l'eau mais qui peuvent être plus ou moins hydratés selon la nature des fibres et protéines qui les constituent.
- Au milieu de ces deux phases, nous trouverons l'eau libre où se trouvent des molécules hydrophiles comme les sels minéraux, les polysaccharides et quelques protéines qui constituent la graine.

Même s'il est difficile au premier abord d'envisager un procédé d'extraction aqueux pour les huiles d'origine végétale, celui-ci devient attractif à partir du moment où nous pouvons réduire le nombre d'étapes et limiter en même temps l'emploi de solvants organiques. Sans oublier que nous développons un procédé avec zéro déchet car tous les produits peuvent trouver des applications directes. Par exemple, la phase émulsionnée peut être utilisée comme lubrifiant, la phase aqueuse comme milieu réactionnel conducteur ou comme source d'oligoéléments ou pour l'irrigation des cultures, et le culot, libre de tout solvant organique et riche en protéines et fibres, peut être exploité dans la filière alimentaire.

1.10 Conclusion

Dans ce premier chapitre, nous avons présenté le contexte économique et environnemental qui affecte les procédés de fabrication dans l'industrie. Ainsi, dans le cadre du projet IBIOLAB, nous avons exposé notre souhait de développer un procédé « doux et propre » qui puisse permettre l'obtention d'émulsions stables pour leur emploi comme biolubrifiants.

Dans ce même chapitre, nous avons aussi présenté la démarche que nous proposons de suivre : La création des milieux émulsionnés en valorisant la structure organisée que présentent les lipides à l'intérieur des graines oléoprotéagineuses. Ainsi, nous avons présenté ces structures en même temps que leur composition, en découvrant que ce sont des phospholipides et des protéines spécifiques qui protègent ces corps lipidiques.

Pour atteindre cet objectif, nous devons adapter des technologies qui permettent la transformation de la graine en remplissant les critères du label écologique européen. Auparavant, il nous semble pertinent de faire une étude fondamentale pour mieux comprendre le rôle des tensioactifs naturels sur la stabilité des oléosomes en milieu aqueux. Ainsi, nous pourrons mieux réagir aux contraintes auxquelles nous sommes confrontés lors du développement du procédé.

1.11 Références bibliographiques

1. *Improvement of Biolubricant Manufacturing and Development thanks to the Obtaining of EcoLABels in a wide Range of Industrial Sectors. Project no.: COLL-CT-2006-030307.*

2. *Ecolabel européen pour les lubrifiants (2005/360/EC).*

3. Colonna, P., *La chimie verte*. **2006**, Paris: Tec & Doc.

4. Anastas, P.T. and Warner, J.C., *Green chemistry: theory & practice*. **1998**, New York: Oxford University Press. p. 30.

5. Sarma, K.M., *The Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer*. United Nations Environment Programme, **2000**.

6. *Kyoto Protocol To The United Nations Framework Convention On Climate Change.* United Nations, **1998**.

7. *Cop 15 Copenhagen.* United Nations Climate Change Conference, **2009**.

8. *REACH Guidance.* European Chemicals Agency, **2009**.

9. *Council Directive 1999/13/EC on the limitation of emissions of volatile organic compounds due to the use of organic solvents in certain activities and installations*. **1999**, OJ L 85, 29.3.1999, p. 1.

10. Afnor Certification, **2009**.

11. McManus, M.C., Hammond, G.P., and Burrows, C.R., *Life-cycle assessment of mineral and rapeseed oil in mobile hydraulic systems.* Journal of Industrial Ecology, **2003**. 7(3-4): p. 163-177.

12. Theo Mang, W.D., *Lubricants and Lubrication*. 2nd ed. **2007**, Weinheim: WILEY-VCH. p. 1-6.

13. *World Lubricants: Industry Study with Forecasts for 2012 & 2017*, Freedonia, Editor. **2009**: Cleveland.

14. Boyde, S. *High performance Lubricants from Renewable Raw materials*. in *Lubricating the Market: the future for Bio-Based Lubricants an ACTIN conference*. **May 2002**. Warwick.

15. Ehrenberg, J. *Current situation and future prospects of EU industry using renewable raw materials*. in *coordinated by the European Renewable Resources & Materials Association*. **February 2002**. Brussels.

16. *Background Document: development of criteria for the award of the European Eco-label to lubricants*. in *IVAM*. **2004**.

17. *Lubrizol analysis, European Union Overview (Chapter 4)*. in *Interactive European Network*. **2000**.

18. Whitby, R.D. *Biolubricants: the green way to make the earth move: concern over the impact of petroleum-based lubricants on the planet,* . in *Oils & Fats International*. **November 2006**.

19. *M/430: CEN mandaté pour le développement de normes européennes et les ateliers d'accord de CEN pour les biopolymères et les biolubrifiants en relation avec les aspects des bioproduits.*

20. De Luca, M., Rocha-Filho, P., Grossiord, J.L., Rabaron, A., Vaution, C., and Seiller, M., *Les émulsions multiples.* International Journal of Cosmetic Science, **1991**. 13(1): p. 1-21.

21. Salager, J.L., Anton, R., and Aubry, J.M., *Formulation des émulsions par la méthode du HLD.* Techniques de l'ingénieur. J 2158: p. 1-15.

22. van Oss, C.J., *Acid-base interfacial interactions in aqueous media.* Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, **1993**. 78(1-3): p. 1-49.

23. Dalmazzone, C., *Génération mécanique des émulsions.* Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP, **2000**. 55(3): p. 281-305.

24. Schramm, L.L., *Emulsions: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*, in *Petroleum Emulsions: Basic Principles*, L.L. Schramm, Editor. **1992**, Advances in Chemistry Series. p. 1-49.

25. Gopal, E.S.R., *Principles of emulsion formation*, in *Emulsion Science*, P. Sherman, Editor. **1968**, Academic: New York & Londres. p. 1-72.

26. Brochette, P., *Emulsification : Elaboration et étude des émulsions.* Techniques de l'ingénieur. J 2150: p. 1-18.

27. Schmitt, T.M., *Analysis of surfactants*, in *Analyses of Fats, Oils, and Lipoproteins*, E.G. Perkins, Editor. **1991**, AOCS Press. p. 331-43.

28. Meller, A. and Stavans, J., *Stability of Emulsions with Nonadsorbing Polymers.* Langmuir, **1996**. 12(2): p. 301-304.

29. Friberg, S. and Larsson, K., *Liquid crystals and emulsions.* Advances in Liquid Crystals, **1976**. 2: p. 173-97.

30. Scarlett, A.J., Morgan, W.L., and Hildebrand, J.H., *Emulsification by Solid Powders.* The Journal of Physical Chemistry, **2002**. 31(10): p. 1566-1571.

31. Israelachvili, J.N., *Intermolecular and surface forces*. 2nd ed. **1992**, London: Academic Press, Inc. p. 213-259.

32. Scheludko, A., *Thin liquid films.* Advances in Colloid and Interface Science, **1967**: p. 391.

33. Dalmazzone, C., Noïk, C., and Clausse, D., *Applications de la DSC pour la caractérisation des systèmes émulsifiés.* Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP, **2009**. 64(5): p. 543-555.

34. Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., and Snabre, P., *TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis.* Talanta, **1999**. 50(2): p. 445-456.

35. Chen, G. and He, G., *Separation of water and oil from water-in-oil emulsion by freeze/thaw method.* Separation and Purification Technology, **2003**. 31(1): p. 83-89.

36. Bothorel, P., *Introduction à l'étude des emulsions, dans phénomènes d'interface, agents de surface*, ed. T. J. Briant. **1989**. p. 209-280.

37. Knepp, J.E., *Metal working lubricant*. **1975**, (Aluminum Co. of America, USA). US 3,923,671. p. 1-5.

38. Knepp, J.E., Johnston, W.G., and Jursich, M.J., *Synthetic metal working lubricant*. **1981**, (Aluminum Co. of America, USA). US 4,243,537. p. 1-4.

39. Sturwold, R.J., *Modified triglyceride metal working lubricants*. **1978**, (Unilever-Emery N. V., Neth.). US 4,075,393. p. 1-22.

40. Guth, J., Lentner, V., and Cappabianca, C., *Safflower oleosomes - natural, multifunctional, emulsifiers.* SOFW Journal, **2005**. 131(7): p. 50,52-56.

41. Huang, A.H.C., *Oil Bodies and Oleosins in Seeds.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **1992**. 43(1): p. 177-200.

42. *SemBioSys Genetics Inc. 2005.*

43. Murphy, D.J. and Cummins, I., *Seed oil-bodies: isolation, composition and role of oil-body apolipoproteins.* Phytochemistry, **1989**. 28(8): p. 2063-9.

44. Tzen, J.T., Lie, G.C., and Huang, A.H., *Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies.* The Journal of Biological Chemistry, **1992**. 267(22): p. 15626-15634.

45. Tzen, J.T.C., Cao, Y., Laurent, P., Ratnayake, C., and Huang, A.H.C., *Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species.* Plant Physiology, **1993**. 101(1): p. 267-276.

46. Tzen, J.T.C., Lai, Y.-K., Chan, K.-L., and Huang, A.H.C., *Oleosin Isoforms of High and Low Molecular Weights Are Present in the Oil Bodies of Diverse Seed Species.* Plant Physiology, **1990**. 94(3): p. 1282-1289.

47. Li, M., Murphy, D.J., Lee, K.-H.K., Wilson, R., Smith, L.J., Clark, D.C., and Sung, J.-Y., *Purification and Structural Characterization of the Central Hydrophobic Domain of Oleosin.* The Journal of Biological Chemistry, **2002**. 277(40): p. 37888-37895.

48. Capuano, F., Beaudoin, F., Napier, J.A., and Shewry, P.R., *Properties and exploitation of oleosins.* Biotechnology Advances, **2007**. 25(2): p. 203-206.

49. Li, M., Smith, L.J., Clark, D.C., Wilson, R., and Murphy, D.J., *Secondary structures of a new class of lipid body proteins from oilseeds.* The Journal of Biological Chemistry, **1992**. 267(12): p. 8245-8253.

50. Erickson, M.C., *Chemistry and Function of Phospholipids*, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, C.C. Akoh and D.B. Min, Editors. **2002**, Marcel Dekker: New York. p. 41-62.

51. Harada, T., Kashihara, K., and Nio, N., *Oleosin/phospholipid complexes suitable for use as emulsion stabilizers, and process for producing the same*. **2002**, (Ajinomoto Co., Inc., Japan). WO 2002026788. p. 29.

52. Tzen, J.T. and Huang, A.H., *Surface structure and properties of plant seed oil bodies.* The Journal of Cell Biology, **1992**. 117(2): p. 327-335.

53. Roux, E.M.A., *Les oléosines, de nouveaux émulsifiants d'origine végétale. Comparaison des globules lipidiques extraits de végétaux (A. thaliana) et de levures (Y. lipolytica)*, in *UMR de Chimie Biologique INRA/INA P-G*. **2003**, Institut National Agronomique: Paris-Grignon. p. 1-199.

54. Bockisch, M., *Fats and Oils Handbook*. **1998**, Champaign, Illinois: AOCS Press. p. 180.

55. Millichip, M., Tatham, A.S., Jackson, F., Griffiths, G., Shewry, P.R., and Stobart, A.K., *Purification and characterization of oil-bodies (oleosomes) and oil-body boundary proteins (oleosins) from the developing cotyledons of sunflower (Helianthus annuus L.).* Biochemical Journal, **1996**. 314(1): p. 333-7.

56. Simpson, T. and Nakamura, L., *Phospholipid degradation in membranes of isolated soybean lipid bodies.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1989**. 66(8): p. 1093-1096.

57. White, D.A., Fisk, I.D., Mitchell, J.R., Wolf, B., Hill, S.E., and Gray, D.A., *Sunflower-seed oil body emulsions: Rheology and stability assessment of a natural emulsion.* Food Hydrocolloids, **2008**. 22(7): p. 1224-1232.

58. Iwanaga, D., Gray, D.A., Fisk, I.D., Decker, E.A., Weiss, J., and McClements, D.J., *Extraction and Characterization of Oil Bodies from Soy Beans: A Natural Source of Pre-Emulsified Soybean Oil.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**. 55(21): p. 8711-8716.

59. Boucher, J., Chabloz, C., Lex, O., and Marison, I.W., *Oleaginous seeds, press-cake and seed husks for the biosorption of metals.* J. Water Supply: Res. Technol.--AQUA, **2008**. 57(7): p. 489-499.

60. Mechling, E., *Mise au point d'un réacteur multitâches adapté à la production des composés oléophiles à partir des milieux réactionnels issus des graines oléagineuses*. **2002**, INP: Toulouse.

61. Mouloungui, Z. and Mechling, E., *Process for preparation of fatty acids by in situ hydrolysis of the lipids contained in seeds of a plant*. **2004**, (INRA, INP Toulouse): FR 2843970. p. 55.

62. Cater, C., Rhee, K., Hagenmaier, R., and Mattil, K., *Aqueous extraction—An alternative oilseed milling process.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1974**. 51(4): p. 137-141.

63. Rosenthal, A., Pyle, D.L., and Niranjan, K., *Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction.* Enzyme and Microbial Technology, **1996**. 19(6): p. 402-420.

64. Hou, C., *Characterization of new yeast lipases.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1997**. 74(11): p. 1391-1394.

65. James, J.J., Lakshmi, B.S., Seshasayee, A.S.N., and Gautam, P., *Activation of Candida rugosa lipase at alkane-aqueous interfaces: A molecular dynamics study.* FEBS Letters, **2007**. 581(23): p. 4377-4383.

66. Pawel, G., Yunge, L., Joseph, D.S., and Miroslaw, C., *Two conformational states of Candida rugosa lipase.* Protein Science, **1994**. 3(1): p. 82-91.

67. Nagayama, K., Yamasaki, N., and Imai, M., *Fatty acid esterification catalyzed by Candida rugosa lipase in lecithin microemulsion-based organogels.* Biochemical Engineering Journal, **2002**. 12(3): p. 231-236.

68. Lubineau, A., Augé, J., and Queneau, Y., *Water-Promoted Organic Reactions.* Synthesis, **1994**. 1994(08): p. 741-760.

Chapitre 2

Procédé Intégré :

Approche Ingénierie Inverse

2.1 Démarche : Ingénierie Inverse 63
2.2 Purification des constituants..... 64
2.2.1 Purification des oléosines..... 65
2.2.2 Caractérisation des oléosines 68
2.2.3 Purification de phospholipides de colza du commerce 69
2.2.4 Isolement des composants non membranaires 71
2.2.5 Purification de la trioléine 71
2.3 Activité interfaciale des constituants purifiés 72
2.4 Reconstitution d'oléosomes 73
2.4.1 Effet de la proportion phospholipides/oléosines sur la taille de gouttelettes ... 75
2.4.2 Floculation d'oléosomes reconstitués avec différentes proportions PL/OL 76
2.4.3 Démixtion par coalescence..... 81
2.4.4 Effet de la présence de constituants non membranaires..... 82
2.5 Caractérisation de phospholipides et oléosines à l'interface huile/eau 82
2.5.1 Cinétiques d'adsorption à l'interface de constituants membranaires..... 82
2.5.2 Caractérisation rhéologique à l'interface huile/eau des constituants membranaires 85
2.6 Caractérisation de phospholipides et d'oléosines à l'interface air/eau 89
2.6.1 Isotherme de compression..... 90
2.6.2 Effet synergique entre oléosines et phospholipides 93
2.7 Conclusions 95
2.8 Références bibliographiques 96

CHAPITRE 2

Procédé Intégré : Approche Ingénierie Inverse

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats de l'étude sur la compréhension du comportement des oléosines et phospholipides dans leur rôle de stabilisants des oléosomes en milieu aqueux. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'Unité de Chimie Biologique Industrielle de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, dans le cadre du programme européen IBIOLAB. Nos deux équipes de recherche ont contribué à part égale à la réalisation du Workpackage WP 4. Nous nous sommes intéressés au rôle qu'ont les constituants de l'émulsion provenant du procédé intégré, et plus particulièrement les oléosines et les phospholipides, sur la stabilité des oléosomes en milieu aqueux. Rappelons que notre objectif est de créer des émulsions stables huile dans l'eau. La démarche consiste en la reconstitution d'oléosomes. Différents rapports massiques entre les agents émulsifiants ont permis d'analyser le rôle de ces derniers dans la stabilisation des émulsions natives huile dans l'eau. Aussi une caractérisation de leurs propriétés physico-chimiques à l'interface a été effectuée avec des mesures de tension interfaciale statique et dynamique pour mieux appréhender leur comportement à l'interface. Tout au long de cette étude, nous avons utilisé les agroconstituants de la graine de colza, modèle de nos travaux de recherche.

2.1 Démarche : Ingénierie Inverse

Quand un système est composé de plusieurs constituants, il semble difficile de comprendre le fonctionnement ou le rôle que chacun peut y apporter avec de possibles interactions entre eux. Une stratégie utilisée dans ce type de cas est l'ingénierie inverse, également appelée rétro-ingénierie, rétro-conception ou ingénierie inversée. Cette stratégie consiste en l'étude des composants d'un objet pour déterminer leur fonctionnement interne ou sa méthode de fabrication.

Dans cette étude, nous avons étudié les mécanismes de stabilisation des émulsions produites par le procédé intégré à partir de graines, en prenant comme modèle la graine de

colza. Les constituants étudiés sont les oléosines et les phospholipides connus pour être les éléments clés dans la stabilisation des oléosomes.

L'étude physicochimique de chacun de ces constituants isolés puis en systèmes complexes permettra, au travers de reconstitutions d'émulsions, de mieux comprendre le mécanisme de stabilisation de ces dernières.

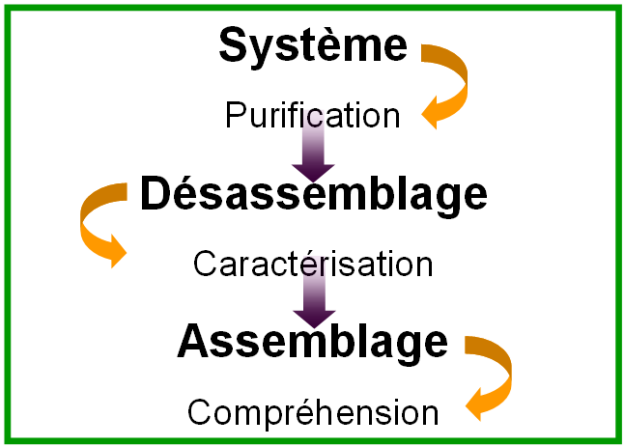


Figure 1 : Schéma des différentes étapes proposées pour cette étude avec une approche d'ingénierie inverse

Dans la Figure 1, nous trouvons un récapitulatif des étapes impliquées dans cette démarche d'ingénierie inverse. La présentation de ces étapes permet la compréhension du système étudié. Dans notre cas, le système est l'émulsion native formée par des oléosomes dispersés dans un milieu aqueux. Pour désassembler ce système il est opportun d'employer des techniques de purification qui permettent d'obtenir séparément les différents constituants d'intérêt : phospholipides, oléosines et constituants non membranaires. Ensuite nous exploitons cet état isolé des constituants pour effectuer leur caractérisation physico-chimique. Enfin, un assemblage du système par des reconstitutions permettra de déterminer les actions microscopiques et macroscopiques de ces constituants sur le système.

2.2 Purification des constituants

Les constituants qui nous intéressent particulièrement dans cette étude sont les oléosines et les phospholipides. Ces molécules, situées à l'interface huile/eau, peuvent être directement responsables de la stabilité des oléosomes. Même si le pouvoir émulsifiant des

phospholipides et oléosines est bien connu[1, 2], leurs rôles et possibles interactions dans la stabilité des corps lipidiques restent à explorer. Nous nous intéressons également aux molécules hydrosolubles qui entourent les oléosomes de la graine oléoprotéagineuse, comme les protéines, les sucres et les minéraux. Ceux-ci peuvent aussi influencer la stabilité des émulsions natives.

C'est ainsi que nous choisissons d'abord d'effectuer une étude systématique du comportement des phospholipides et des oléosines et dans un deuxième temps une étude sur l'effet que les molécules hydrosolubles peuvent avoir sur la stabilisation des oléosomes.

2.2.1 Purification des oléosines

La procédure d'extraction des oléosines est inspirée des travaux déjà décrits dans la littérature[3, 4]. L'isolement des oléosines implique plusieurs étapes. Tout d'abord la séparation des corps lipidiques de la graine par broyage aqueux puis par centrifugation pour obtenir une émulsion. Les protéines et d'autres composants hydrosolubles présents sont ensuite éliminés par des lavages successifs en présence de sels. Après lavage des oléosomes, une délipidation permet d'obtenir une fraction contenant les constituants membranaires de l'oléosome. Enfin, une extraction de la fraction organique complexe par des solvants organiques suivie d'une lyophilisation, permet d'obtenir les oléosines pures.

2.2.1.1 Obtention d'oléosomes

La libération d'oléosomes de la graine entière est réalisée grâce à un broyage en présence d'eau. Par déstructuration de la graine, l'eau est mise en contact avec les oléosomes. Une séparation de phases en fonction de leur densité permettra l'obtention d'une phase enrichie en corps lipidiques sous la forme d'une émulsion compacte.

2.2.1.2 Effet de solutions salines dans le lavage des oléosomes

La fraction riche en oléosomes est lavée de façon à diminuer la présence des constituants hydrosolubles. Nous ajoutons des molécules qui changeront la solubilité des protéines avec l'objectif d'appauvrir le milieu en protéines non membranaires Celles-ci se décrocheront ainsi des oléosomes. Ceci repose sur l'hypothèse que les protéines non

membranaires ne sont pas aussi solidement fixées aux corps lipidiques que les oléosines. Ainsi leur solubilisation dans le milieu de lavage sera favorisée vis-à-vis des oléosines. Pour évaluer l'efficacité des lavages en fonction de la salinité, un dosage des protéines avant et après lavage est effectué.

Dans la Figure 2, nous observons l'effet de différentes solutions de lavage sur l'élimination en protéines de l'émulsion et son enrichissement en lipides et protéines membranaires. Nous observons que les meilleurs résultats sont obtenus avec le tampon Tris-HCl à pH 7 avec 60 % de protéines hydrosolubles éliminées. Cependant, l'émulsion récupérée n'est plus compacte et il est difficile de la séparer de la solution de lavage. Des lavages avec NaOH à pH 7 à 25 ºC ont montré des performances similaires aux lavages effectués uniquement en présence d'eau. Une série de lavages à l'eau chaude a été réalisée sans montrer de nettes améliorations. Le lavage avec une solution de NaCl 3 %, entraîne une élimination de 45 % en protéines tout en gardant une émulsion compacte. C'est la méthode choisie. A la fin, une émulsion appauvrie de moitié en protéines est obtenue. Nous pensons que cette différence est due à l'élimination des protéines non membranaires.

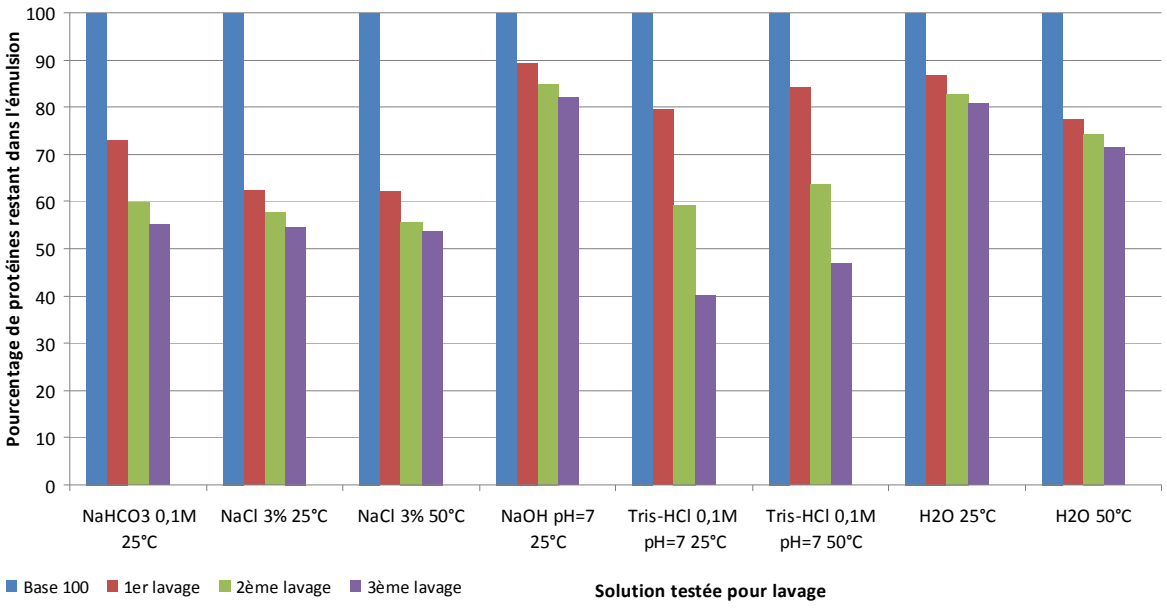


Figure 2 : Teneurs protéiques restantes dans l'émulsion après lavage selon différentes solutions (2 volumes de solution par volume d'émulsion)

2.2.1.3 Délipidation des oléosomes

Les oléosomes, constitués principalement de triglycérides, phospholipides et oléosines, sont soumis à deux extractions consécutives avec des solvants organiques. La première est réalisée à l'éther diéthylique. Elle permet d'extraire les lipides neutres. La seconde utilise un mélange chloroforme/méthanol. Elle aide à éliminer les phospholipides et ainsi obtenir des oléosines pures à l'interface du mélange chloroforme/méthanol.

P.1 Protocole

Les graines de colza Kosto de chez Momont (Compiègne, France), ont été broyées pendant 10 minutes dans l'eau distillée, dans un rapport massique 20/80 à l'aide du mélangeur rotor/stator Silverson L4RT de chez Silverson Machines Ltd (Waterside, England). Ce broyage est suivi de 2 passages successifs dans l'homogénéisateur haute pression APV Lab 1000 (Evreux, France) à une pression de 350 bars. Après cette étape de broyage, qui libère les oléosomes des graines, une centrifugation de 10 minutes à 5 000× g et à 6 °C, à l'aide de la centrifugeuse SIGMA 6K15 Fisher Bioblock Scientific (Illkirch, France), permettra de concentrer et d'isoler les oléosomes du reste des constituants de la graine, dans la phase moins dense. Les oléosomes sont collectés sur un filtre en nylon avec des mailles de 100 µm.

Un volume de l'émulsion obtenue, est dilué avec 2 volumes de NaCl à 3% après une rapide agitation à 5 000 tr/min à l'aide du mélangeur rotor/stator. L'ensemble est centrifugé 10 min à 10 000× g et à 0 °C pour obtenir une émulsion compacte en surface. Ce lavage est suivi de trois lavages à l'eau distillée de façon à éliminer la salinité. La procédure est alors la même que pour le NaCl sauf que la centrifugation est à 15 000× g et la température à -5 °C. L'émulsion après lavage, contenant les oléosomes, est mise en contact avec l'éther diéthylique dans une proportion de 1:3 v/v. Après une agitation vigoureuse, le milieu est centrifugé 5 minutes à 200× g et à température ambiante. Le surnageant est récupéré et subit la même procédure jusqu'à décoloration totale de la phase organique (4 fois).

Le surnageant libre de triglycérides est ensuite suspendu dans un mélange chloroforme/méthanol (2:1 v/v) dans une proportion 1:2 v/v de surnageant/solvant. Après agitation, le mélange est centrifugé 10 minutes à 5 000× g et à température ambiante. Le matériel interfacial est récolté et la procédure est répétée trois fois de plus. Cette phase

intermédiaire, libre de phospholipides, est suspendue dans 2 volumes d'eau distillée et placée sous un courant d'azote gazeux afin d'évaporer les traces d'éther diéthylique. La solution est ensuite séchée dans un lyophilisateur Cryo-Rivoire (St-Gély du Fesc, France) pour obtenir les oléosines en poudre.

2.2.2 Caractérisation des oléosines

Deux méthodes d'analyse des protéines ont été testées sur les oléosines purifiées. La méthode de Kjeldahl[5] permet une analyse quantitative. Elle permet de constater une teneur en protéine supérieure à 95 %. Ceci nous confirme une forte teneur en protéines sans pour autant préciser le type de protéine présent. Pour cela, une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) a été effectuée pour déterminer la taille des protéines purifiées. Une analyse de la composition en acides aminés a été aussi réalisée selon la méthode de Moore et Stein[6].

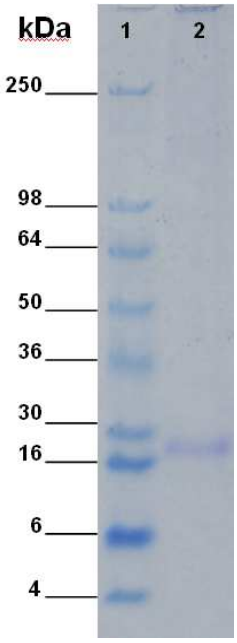


Figure 3 : Gel SDS PAGE (10-20 % de polyacrylamide) après électrophorèse. 1 : Marqueur ; 2 : oléosines

La Figure 3 illustre une image du gel SDS-PAGE. Elle montre bien une seule bande sur la piste 2. Elle correspond aux oléosines purifiées qui, d'après le gel, ont une taille de 20 kDa. Celle-ci coïncide avec la taille décrite par Murphy *et coll.* pour les oléosines de colza[7].

Le Tableau 1 contient la composition en pourcentage molaire d'acides aminés dans les oléosines purifiées. Ce résultat est en accord avec celui obtenu après séquençage nucléotidique du gène d'oléosine de 20 kDa de *Brassica napus*[8].

Tableau 1 : Composition en pourcentage molaire d'acides aminés dans les oléosines purifiées

Acide aminé	Oléosines	Reference[8]
Aspartate	8,00 ± 0,14	9,09
Thréonine	7,10 ± 0,13	10,16
Sérine	7,18 ± 0,08	7,49
Glutamate	10,31 ± 0,06	6,95
Proline	1,94 ± 0,20	2,67
Glycine	11,66 ± 0,17	9,63
Alanine	8,53 ± 0,17	7,49
Valine	6,62 ± 0,25	5,88
Cystéine	0,28 ± 0,03	0
Méthionine	1,34 ± 0,27	3,21
Isoleucine	5,20 ± 0,01	6,42
Leucine	9,64 ± 0,09	8,02
Tyrosine	4,19 ± 0,11	5,35
Phénylalanine	3,98 ± 0,15	2,14
Histidine	2,64 ± 0,03	2,67
Lysine	5,58 ± 0,04	4,28
Tryptophane	0	0,53
Arginine	5,81 ± 0,00	8,02

2.2.3 Purification de phospholipides de colza du commerce

Les phospholipides de colza que nous avons utilisés comme matière première sont commerciaux. Ils sont fournis par la société Lasenor Emul S.L. (Barcelone, Espagne). Après une analyse chromatographique en HPLC-ELSD, la présence de contaminants a été observée. C'est pourquoi nous avons décidé de les purifier. La purification a été accomplie par précipitation à l'acétone froid selon la méthode de Shaik[9].

P.2 Protocole

Les phospholipides commerciaux de chez Lasenor Emul S.L. (Barcelone, Espagne) sont purifiés par cinq cycles de précipitation avec de l'acétone froide. Après agitation vigoureuse, le mélange est centrifugé 20 minutes à 5 200× g et à 4 °C. Le précipité riche en lipides polaires est lyophilisé pour être stocké.

L'analyse des phospholipides a été réalisée par HPLC-ELSD. Le Tableau 2 illustre la composition en phospholipides du mélange extrait. Des variations dans les proportions de phospholipides par rapport aux compositions décrites dans la littérature sont observées. La phosphatidylcholine (PC) avec une teneur de 40,2 % reste le phospholipide majoritaire. La phosphatyléthanolamine (PE) et le phosphatidylinositol (PI) sont présents. Contrairement aux résultats obtenus par Tzen *et coll.*[3] nous retrouvons de l'acide phosphatidique (PA) avec un pourcentage égal à 7,3 % et la phosphatidylsérine (PS) n'est pas présente dans le précipité de phospholipides. Cependant, Katavic *et coll.*[25] ont retrouvé la présence de PA dans l'huile de colza. Ceci peut s'expliquer par une transformation de la PS en PA lors du procédé de purification effectué. En effet, des modifications dans la composition en phospholipides sont décrites dans la littérature. Ces différences peuvent être attribuées à la composition de la graine ou à la fraction de la graine utilisée, aux méthodes de purification, sans ignorer le facteur que peut apporter la technique analytique. De plus, Simpson et Nakamura[10], ont montré des changements dans la composition de phospholipides des corps lipidiques de soja isolés, par la conversion de PC et PE en PA. Ils présument que ceci est dû à l'activité de la phospholipase D. Novotná *et coll.*[11] ont purifié et caractérisé cette phospholipase D à partir du colza. Nous pouvons donc penser que ces différences dans le profil des phospholipides peuvent aussi être attribuées à cette enzyme endogène.

Tableau 2 : Composition des phospholipides présents dans la fraction purifiée en pourcentage massique : PA (acide phosphatidique), PE (phosphatyléthanolamine), PI (phosphatidylinositol) et PC (phosphatidylcholine)

Phospholipides	Teneur massique
PA	7,3 %
PE	23,0 %
PI	11,6 %
PC	40,2 %

2.2.4 Isolement des composants non membranaires

L'isolement des constituants non membranaires a été réalisé par filtration de la phase aqueuse récupérée lors de la libération des corps lipidiques (pour éviter toute présence d'oléosomes), suivie d'une lyophilisation de façon à éliminer l'eau présente.

P.3 <u>Protocole</u>

La phase aqueuse issue du procédé intégrée a d'abord été centrifugée 5 minutes à 10 000× g et à 6 °C, pour ensuite être filtrée à l'aide d'une membrane en nitrate de cellulose d'une porosité de 0,45 µm. Après filtration, le milieu est séché à l'aide d'un lyophilisateur Cryo-Rivoire afin d'obtenir ces composants en poudre.

2.2.5 Purification de la trioléine

La trioléine est prise comme huile modèle pour les études des cinétiques d'adsorption et les études de caractérisation rhéologique des phospholipides et des oléosines. Le but est d'éviter les possibles interférences dues aux constituants mineurs de l'huile de colza. La trioléine est un triglycéride constitué de trois chaînes oléiques. Ces acides gras sont majoritaires dans la graine de colza. La trioléine a été purifiée selon le protocole décrit par Gaonkar[12].

P.4 <u>Protocole</u>

La trioléine, provenant de chez Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, France), est purifiée par filtration sur colonne de silice florisil préalablement activée à 160 °C pendant 16 heures. 20 grammes de silice florisil ont été employés par litre de trioléine. Pour éviter tout phénomène d'oxydation, le montage a été protégé de la lumière et de l'oxygène et mis sous courant d'azote.

2.3 Activité interfaciale des constituants purifiés

Tout d'abord nous avons étudié l'activité interfaciale de chaque constituant pris séparément. L'activité interfaciale est évaluée par mesure des tensions à l'interface huile/eau, où l'huile est de l'huile de colza commerciale et l'eau est déminéralisée. Ces mesures ont été réalisées avec un tensiomètre équipé d'une lame de Wilhelmy en platine à une température de 25 °C.

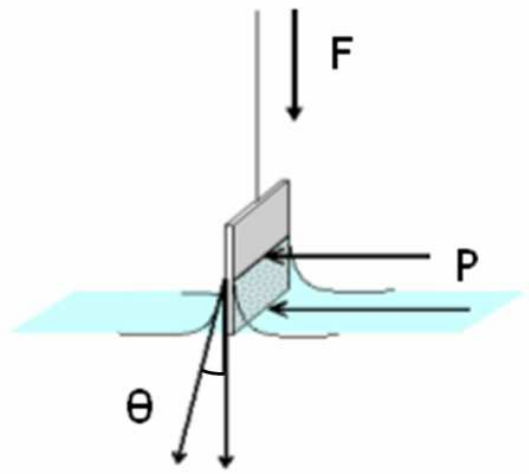


Figure 4 : Schéma de la lame de Wilhelmy plongée entre deux liquides non miscibles avec les paramètres qui interviennent dans la mesure de tension interfaciale

Cet outil sert à mesurer la tension interfaciale à partir de mesures de la force nécessaire pour décrocher cette lame de l'interface étudiée. Le bilan des forces verticales montre qu'à l'équilibre, soit au moment de l'arrachage de la lame de l'interface, la force F supportée par la lame est égale à la force fournie par l'interface (Figure 4). On peut donc écrire l'équation :

$$\gamma = \frac{F}{P \cdot \cos\theta}$$

où :

F est la composante verticale de la tension de surface (γ)

θ est l'angle de contact du ménisque avec la lame

P est le périmètre de la lame en contact avec la surface liquide

P.5 Mesure de tension interfaciale : Lame de Wilhelmy

Ces mesures ont été réalisées avec un tensiomètre GBX, 3S (Drôme, Romans-sur-Isère, France) équipé d'une lame de Wilhelmy en platine à une température de 25 °C. L'huile de colza est commerciale (Lesieur, Asnières-sur-Seine, France), tandis que l'eau est purifiée avec le système de filtration Milli-Q Millipore (Milford, USA). Les constituants à étudier sont dissous dans la phase où ils sont le plus solubles : les protéines (oléosines et composants non membranaires) dans l'eau et les phospholipides dans l'huile à une concentration de 5 et 1 % respectivement. Les deux phases sont introduites dans un cristallisoir en respectant l'ordre affiché dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Mesures de tension interfaciale (TI) dans le système huile/eau en présence des différents constituants

Système		TI [mN/m]
Phase Supérieure	**Phase Inférieure**	
Huile	Eau	12,8
Huile + Phospholipides	Eau	0,0
Huile	Eau + Composants Non membranaires	13,9
Huile	Eau + Oléosines	3,7

D'après les résultats répertoriés dans le Tableau 3, les phospholipides et les oléosines ont montré une activité à l'interface huile/eau en diminuant considérablement la tension interfaciale (TI). D'autre part, les composants non membranaires ont un effet négatif et peu significatif sur l'activité interfaciale. Nous concluons ainsi que ce sont les constituants membranaires qui présentent les meilleures propriétés tensioactives.

2.4 Reconstitution d'oléosomes

Après cette étude physicochimique préliminaire, nous avons essayé de réaliser la reconstitution d'oléosomes pour observer l'effet microscopique et macroscopique des phospholipides et des oléosines vis-à-vis de la stabilisation des corps lipidiques. Des essais ont été réalisés en utilisant différentes proportions phospholipides/oléosines (PL/OL) afin d'évaluer l'influence des oléosines et des phospholipides individuellement sur la stabilisation de ces systèmes émulsionnés, et de mettre en évidence une possible synergie d'actions de ces

constituants.

Les reconstitutions ont été effectuées avec les phospholipides et les oléosines qui ont été préalablement isolés. De l'huile de colza raffinée achetée dans le commerce, Lesieur (Asnières-sur-Seine, France), et de l'eau purifiée avec le système de filtration Milli-Q, ont constitué les phases principales de ces reconstitutions. Ces reconstitutions ont été réalisées sans modification du pH (pH natif = 5,5). Dans le Tableau 4, les compositions massiques des différents essais sont indiquées. Nous avons maintenu les compositions d'eau et d'huile constantes dans toutes les reconstitutions. Nous observons aussi que l'essai 7 est le seul à avoir dans sa composition de composants non membranaires. Celui-ci a été réalisé pour évaluer justement le rôle que ces constituants exercent dans la stabilité de corps lipidiques. Cet essai a été réalisé avec la proportion PL/OL=0,015 théorique dans les oléosomes natifs.

Tableau 4 : Compositions en pourcentages massiques (%) des différents constituants dans les différents essais de reconstitutions d'oléosomes

Constituants	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6	Essai 7
	PL=0	OL=0	PL/OL=50	PL/OL=5	PL/OL=0,5	PL/OL=0,015	PL/OL=0,015
Oléosines	2,00	0,00	0,04	0,33	1,33	2,00	2,00
Phospholipides	0,00	2,00	1,96	1,67	0,67	0,03	0,03
Composants Non Membranaires	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00
Huile	38,00	38,00	38,00	38,00	38,00	38,00	34,00
Eau	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00	60.00	60.00

P.6 Protocole

Les différentes préparations sont réalisées dans des tubes à essais de 10 mL. Les constituants sont ajoutés en introduisant d'abord les phospholipides et les oléosines pour permettre une compétitivité d'absorption aux molécules, due à la capacité d'absorption élevée qui peut entraîner des différences à cause de l'ordre d'ajout. L'émulsification a été effectuée à l'aide d'une sonde d'ultrasons (SONICS Vibracell) pendant 3 minutes à 20 kHZ et 200 W, avec une alternation de sonication et relaxation de 5 s/25 s pour éviter l'échauffement excessif de la préparation. Tous les essais ont été stockés à température ambiante.

Les rôles et interactions des constituants dans la stabilité de corps lipidiques ont été évalués par la taille moyenne de gouttelettes, les valeurs absolues de potentiel zêta ainsi que par l'observation des phénomènes de déstabilisation : la floculation et le crémage.

2.4.1 Effet de la proportion phospholipides/oléosines sur la taille de gouttelettes

La taille de gouttelette est un paramètre important dans la stabilité d'une émulsion. Au long de cette étude, la taille de gouttelettes a été déterminée par traitement d'images à partir d'observations de microscopie optique.

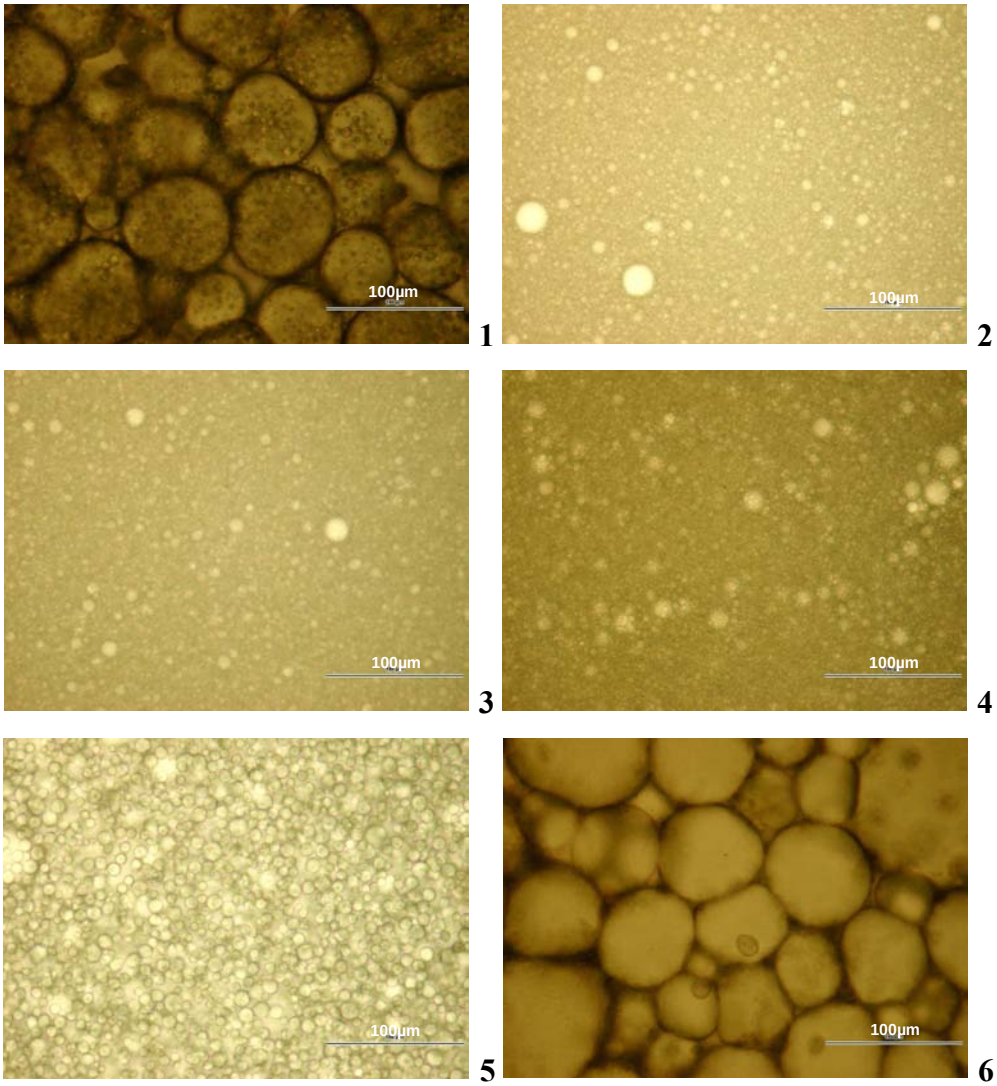


Figure 5 : Observation microscopique x 400 4 d'oléosomes reconstitués où l'échelle représente 100 µm : 1) PL=0, 2) OL=0, 3) PL/OL=50, 3) PL/OL=50, 4) PL/OL=5, 5) PL/OL=0,5 et 6) PL/OL=0,015

Dans la Figure 5, nous trouvons les images des reconstitutions d'oléosomes contenant différentes proportions de phospholipides/oléosines (PL/OL), ce qui induit des variations importantes sur la taille moyenne de gouttelettes (Tableau 5).

Des tailles importantes autour de 50 µm sont obtenues en absence de phospholipides ou en présence d'une forte teneur en oléosines (essais 1 et 6 correspondant à PL=0 et à PL/OL=0,015 respectivement). Ceci entraîne aussi une augmentation dans la polydispersité de leur taille. En effet, la polydispersité des différentes reconstitutions est corrélée à leur écart type (Tableau 5). Cette valeur correspond à l'écart type de chaque taille moyenne, ce qui montre la dispersion des valeurs de la population d'objets observés. Au contraire, avec une concentration élevée en phospholipides (essais 3 et 4 correspondant à PL/OL=50 et à PL/OL=5 respectivement), la taille de gouttelettes prend des valeurs proches de celles des oléosomes natifs, soit entre un et deux microns.

Tableau 5 : Taille moyenne de gouttelettes des différentes reconstitutions d'oléosomes avec différentes proportions massiques phospholipides/oléosines (PL/OL)

Essai	PL/OL	Taille moyenne de gouttelettes (µm)
1	PL=0	47 ± 32
2	OL=0	1,44 ± 0,74
3	PL/OL=50	1,15 ± 0,57
4	PL/OL=5	1,70 ± 0,63
5	PL/OL=0,5	7,15 ± 3,07
6	PL/OL=0,015	110,45 ± 93,57

2.4.2 Floculation d'oléosomes reconstitués avec différentes proportions PL/OL

Ces reconstitutions de corps lipidiques sont des émulsions qui peuvent subir des phénomènes physiques de déstabilisation comme la floculation. Ce phénomène, d'après la théorie de DLVO[13], est associé à des forces d'interactions de type Van der Waals (attractives) et électrostatiques (répulsives) qui coexistent. La floculation provoque l'augmentation de la taille des corps en suspension, ce qui induit le crémage de l'émulsion.

Ce phénomène est mis en évidence en suivant visuellement le crémage sur les reconstitutions au cours du temps. En effet, la vitesse de ce crémage est associée directement à la taille des particules suspendues suivant l'équation de Stokes :

$$V=\frac{2r^2 g(\rho_{huile}-\rho_{eau})}{9\eta_0}$$

où :

r est le rayon des gouttelettes (en m)

g l'accélération de la pesanteur (en m/s²)

ρ est la densité (en kg/m^3)

η_0 est la viscosité de la phase continue (en Pa·s : kg·m^{-1}·s^{-1})

Le phénomène de floculation est associé aux forces de répulsion engendrées par les particules portant des charges du même type. Ainsi des mesures de potentiel zêta nous permettront de mettre en évidence ce phénomène sur les reconstitutions.

2.4.2.1 Effet du potentiel zêta

Le potentiel zêta est une mesure reliée aux charges portées par les corps en suspension. Cette charge est induite par les molécules qui se trouvent à leur surface, qui dans notre cas sont les phospholipides et les oléosines, et le milieu environnant. Le potentiel zêta a été mesuré à l'aide d'un zetasizer NanoZS de Malvern Instruments S.A. (Orsay, France).

Dans la Figure 6, nous montrons l'évolution de cette valeur en fonction de la teneur massique de phospholipides dans la reconstitution à pH de 5,5. Une diminution de la valeur absolue du potentiel zêta est observée lorsque la concentration des oléosines augmente. La faible présence de charges électrostatiques avec des valeurs absolues du potentiel zêta inférieures ou égales à 30 mV pour les essais de reconstitution 1 (PL=0 %) et 6 (PL=0,03 %) respectivement, semble expliquer parfaitement la grande vitesse de floculation des gouttelettes d'autant plus que la taille individuelle des gouttelettes est élevée : plus le potentiel zêta est élevé, plus la vitesse de floculation est faible.

Pour les reconstitutions où la concentration en phospholipides est entre 0,63 et 2,0, les valeurs absolues du potentiel zêta montrent comment les charges électrostatiques augmentent

en fonction de la teneur en phospholipides, en prenant des valeurs absolues entre 56 et 80 mV. En effet, à un pH de 5,5 les phospholipides sont globalement chargés négativement[14, 15], ce qui renforce les forces de répulsion électrostatique en ralentissant fortement le phénomène de floculation.

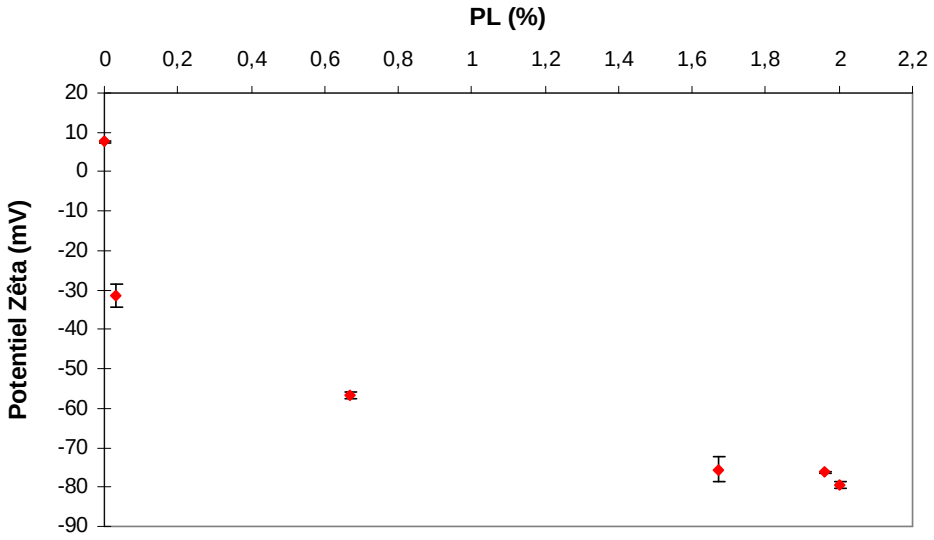


Figure 6 : Evolution de la valeur du potentiel zêta en fonction de la teneur massique en phospholipides

Dans le cas de la reconstitution sans phospholipides, seules les oléosines interviennent dans la stabilisation des corps lipidiques, une faible valeur absolue du potentiel zêta de 7 mV indique la proximité du point isoélectrique de l'oléosome à pH 5,5. Ici, les répulsions électrostatiques sont très faibles, inférieures aux forces d'attraction. Ainsi l'agrégation est favorisée.

2.4.2.2 Crémage

Le crémage est observé sur chacune des reconstitutions au cours du temps, sur une durée de 403 heures. À la fin de cette période d'observation une centrifugation à 200× g est réalisée de façon à accélérer cet effet. Dans le Tableau 6 nous reportons l'évolution de l'aspect visuel des différentes reconstitutions avec le temps.

Le crémage se traduit par l'apparition d'une phase aqueuse inférieure. Ce crémage évolue plus ou moins vite au cours du temps en fonction de la composition en agents émulsifiants.

Tableau 6 : Evolution du crémage des différentes reconstitutions d'oléosomes en fonction du temps

Temps [h]	2	17,5	26	41	50,5	65	167	403	200× g*
Essai 1 PL=0									
Essai 2 OL = 0									
Essai 3 PL/OL=50									
Essai 4 PL/OL=5									
Essai 5 PL/OL=0,5									
Essai 6 PL/OL=0,015									
Essai 7 PL/OL=0,015 + Composants Non Membranaires									

* La centrifugation est réalisée après les 403 heures d'observation

D'après ces observations, une évolution du crémage a été calculée en fonction du temps (Figure 7) et peut être définie par la relation suivante :

$$\text{Crémage} = \frac{\text{Fraction aqueuse}}{\text{Fraction totale}}$$

A partir de ces résultats nous constatons un crémage immédiat pour les essais où une forte teneur en oléosines est présente (PL=0 PL/OL=0,015 et PL/OL=0,5). Ce crémage est accéléré par la taille importante des gouttelettes et des agrégats qui va augmenter les collisions par les forces gravitationnelles.

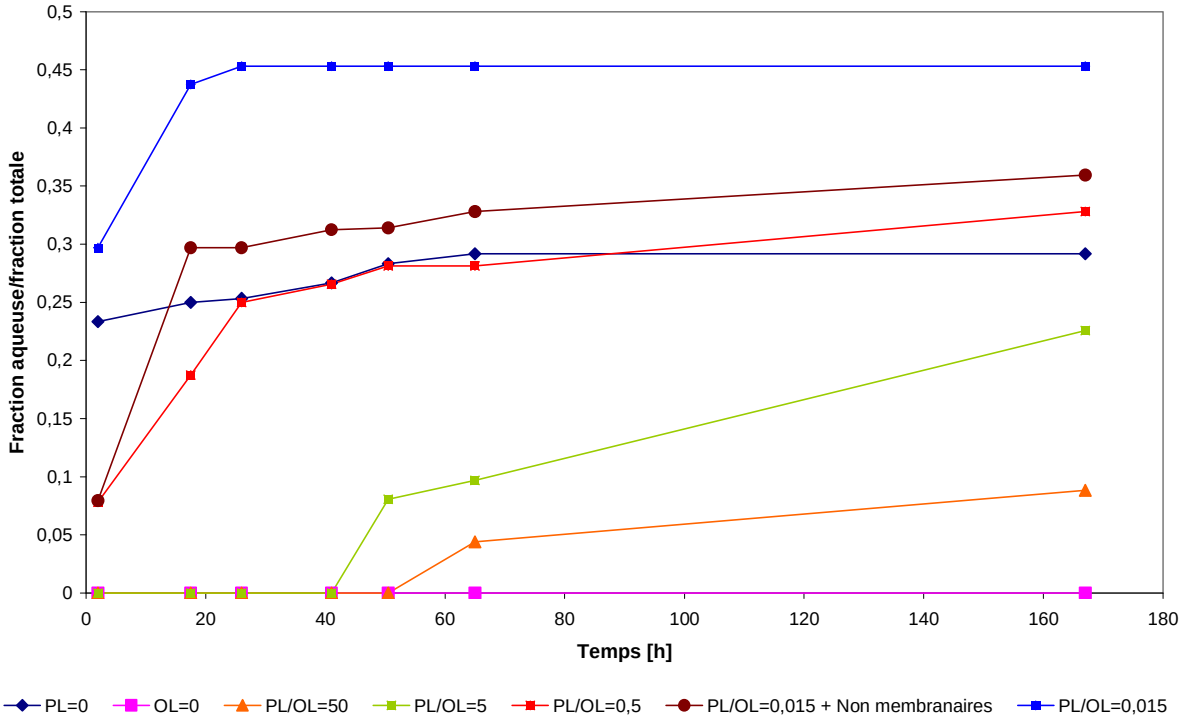


Figure 7 : Evolution du crémage en fonction du temps des différents essais de reconstitution de corps lipidiques avec différentes proportions massiques entre phospholipides/oléosines

Pour le système contenant uniquement de phospholipides (OL=0), une émulsion parfaitement stable est observée pendant toute la durée d'observation. Ceci est probablement engendré par la faible taille des gouttelettes, mais aussi par les charges électrostatiques apportées par les molécules polaires (phospholipides) entourant les corps lipidiques, ce qui augmente les forces de répulsion. Ceci diffère des résultats obtenues par Tzen[3] qui avait

constaté une mauvaise stabilité des corps lipidiques de maïs reconstitués avec les phospholipides.

Dans les reconstitutions où nous faisons varier le rapport PL/OL, le crémage est plus rapide lorsque ce rapport diminue. Ceci peut être expliqué par la diminution de la densité des charges à la surface des oléosomes : les phospholipides chargés sont « dilués » à la surface de l'oléosome lorsque le rapport PL/OL diminue.

2.4.3 Démixtion par coalescence

Après les deux semaines d'observation, les émulsions reconstituées avec soit uniquement des phospholipides ou uniquement des oléosines, ainsi que les reconstitutions où les oléosines sont majoritaires (PL/OL=0,015 et PL/OL=0,5), n'ont pas présenté d'apparition de phase huileuse provoquée par coalescence des gouttelettes. D'autre part, les émulsions reconstituées avec des rapports phospholipides/oléosines de 50 et 5 présentent une déstabilisation au bout de deux semaines avec l'apparition d'une phase huileuse supérieure.

D'après les résultats obtenus et suivant la théorie de DLVO[13], les interactions attractives et répulsives coexistent dans tous les systèmes dispersés. La présence d'oléosines met en jeu des forces attractives de type Van der Waal et des interactions hydrophobes[16]. Lorsque les émulsions sont reconstituées avec uniquement des oléosines, le système est proche du point isoélectrique (déterminé par mesure du potentiel zêta) et les forces électrostatiques sont négligeables. Dans ce cas précis, le crémage est observé, mais sans coalescence. La résistance à la coalescence est probablement induite par les forces de répulsion stérique entre les molécules d'oléosine.

Dans le cas où uniquement les phospholipides sont présents, les forces attractives diminuent, en même temps que la taille des gouttelettes. Ce qui, d'après l'équation de Stokes diminue la vitesse de crémage. Une barrière énergétique, dont la hauteur est directement proportionnelle au carré du potentiel zêta, prévient la floculation. Cependant, dans les reconstitutions où le rapport PL/OL est égal à 50 ou 5, la présence d'oléosines diminue les forces de répulsion électrostatique de 80 à 75 mV, ce qui provoque la floculation. Cependant, dans ce cas, la quantité d'oléosines n'est pas suffisante pour couvrir de façon homogène et

stabiliser l'interface. Les forces de répulsion stériques entre les oléosines ne sont pas assez importantes pour éviter la coalescence.

2.4.4 Effet de la présence de constituants non membranaires

Nous avons voulu observer l'effet des constituants non membranaires sur la stabilité d'oléosomes en milieux aqueux. En effet si ces constituants ne sont pas préférentiellement adsorbés à l'interface, ils auront un effet sur les propriétés de la phase continue. Ils ne provoquent pas d'effet positif sur la tension interfaciale huile/eau (Tableau 3). Cependant, après les reconstitutions effectuées avec un rapport PL/OL=0,015, nous observons qu'en ajoutant des constituants non membranaires, l'évolution du crémage a été ralentie par rapport à la reconstitution avec le même rapport mais sans ces constituants (Figure 7). Il semblerait que ces constituants peuvent apporter une certaine stabilité au crémage même s'ils n'ont aucun effet sur la tension à l'interface huile/eau.

2.5 Caractérisation de phospholipides et oléosines à l'interface huile/eau

Nous avons voulu appréhender davantage le rôle des molécules qui se trouvent à la surface des oléosomes dans la stabilisation des corps lipidiques et vérifier les hypothèses avancées dans la Section 2.4.3. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser la rhéologie interfaciale pour caractériser le comportement des constituants membranaires (phospholipides et oléosines) à l'interface huile/eau.

2.5.1 Cinétiques d'adsorption à l'interface de constituants membranaires

Pour commencer cette caractérisation, des cinétiques d'adsorption à l'interface huile/eau de phospholipides et d'oléosines ont été réalisées par des mesures de tension à l'interface trioléine/eau. Ces mesures ont été réalisées pour différentes compositions en oléosines et en phospholipides à l'aide d'un tensiomètre Tracker.

Ce système permet de former une goutte pendante à l'aide d'une seringue capillaire à l'intérieur d'une cuve contenant la phase non miscible. Dans notre cas, la seringue contient la trioléine et la cuve est remplie par la phase aqueuse contenant du tampon Tris aux pHs 5,5 et 8,5. Le pH 5,5 est le « pH natif » des oléosomes libérés dans l'eau distillée. Le pH 8,5 a été choisi après avoir observé dans les reconstitutions d'oléosomes une meilleure stabilité physique des oléosomes chargés négativement.

P.7 Mesure de tension interfaciale : tensiomètre Tracker

Les mesures de tension à l'interface huile/eau en fonction du temps sont réalisées à l'aide d'un tensiomètre Tracker, IT Concept (Longessaigne, France). Les phospholipides et oléosines sont dissous dans la trioléine. Une concentration en oléosines de 0,1 g/L est constante. Une goutte pendante a été formée à l'aide d'une seringue capillaire de 250 µL (PS20, IT Concept) dans l'intérieur d'une cuve contenant 7 mL de Tris 75 mM ajusté aux pHs 5,5 et 8,5. Toutes les mesures sont réalisées à 25 °C. La tension interfaciale est déterminée par analyse du profil de la goutte selon la loi de Laplace :

$$\Delta P = \sigma\left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2}\right)$$

où :

ΔP est la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte

σ est la tension interfaciale

r_x sont les rayons principaux d'une section d'aire de la surface de la goutte

Nous voyons sur la Figure 8 que les cinétiques d'adsorption à l'interface trioléine/eau (Tris 75 mM, pH 8,5), sont très rapides pour les oléosines ou les mélanges PL/OL. En effet, la tension à l'interface trioléine/eau, qui présente une valeur de 10 mN/m à 25 °C, est immédiatement diminuée après introduction des molécules et s'équilibre dans un temps relativement court.

Il faut remarquer que les cinétiques d'adsorption pour les oléosines ou les mélanges PL/OL à l'interface trioléine/eau (Tris 75 mM, pH 5,5), sont similaires à celles obtenues à pH 8,5. Aucune différence significative n'a été observée en fonction du pH ni en fonction du rapport PL/OL. Pour cette raison, elles ne sont pas présentées dans le présent manuscrit.

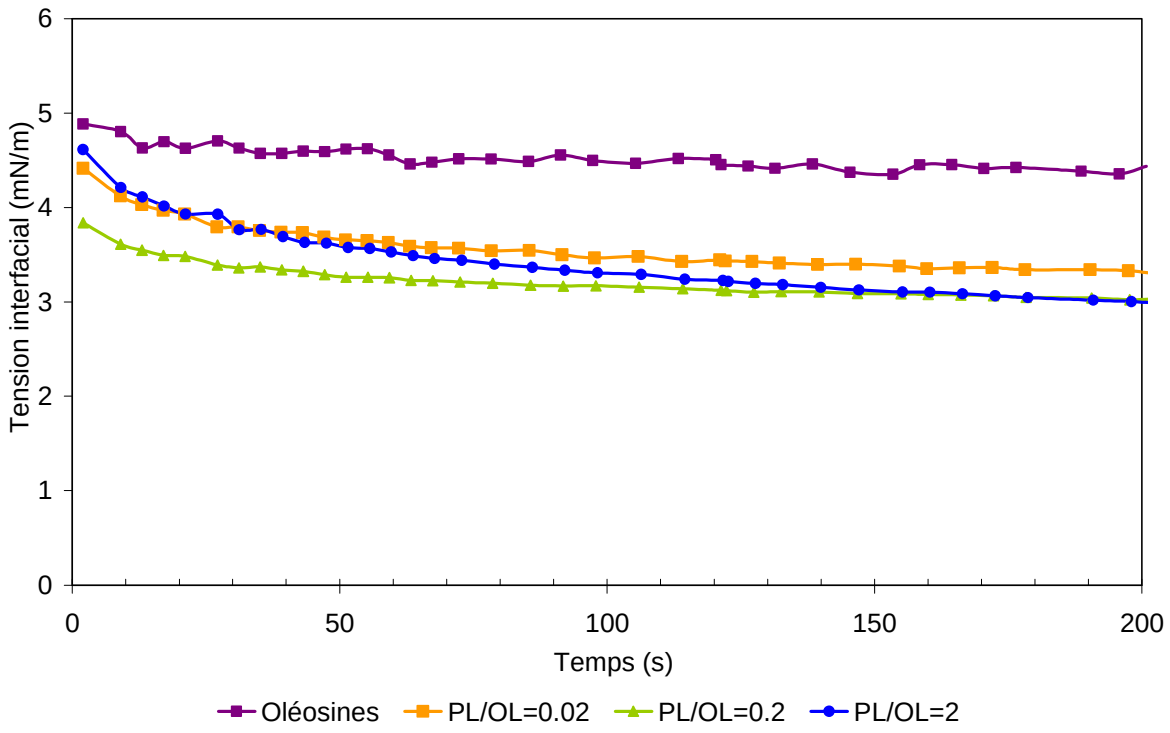


Figure 8 : Evolution de la tension de l'interface trioléine/phase aqueuse (Tris 75 mM, pH 8,5) en fonction du temps en présence de différents rapports massiques PL/OL

En l'absence de phospholipides, les oléosines, à une concentration de 0,1 g/L, s'adsorbent rapidement à l'interface pour atteindre l'équilibre après 50 secondes. Quand les phospholipides sont ajoutés, l'équilibre est atteint en 200 secondes.

Les oléosines, avec un poids moléculaire de 20 kDa, ont une taille moléculaire comparable à celle de la β-lactoglobuline et de la β-caséine[17], qui sont des protéines globulaires bien connues pour leurs propriétés émulsifiantes. Cependant, les oléosines présentent une adsorption à l'interface huile/eau plus rapide[18]. Ceci confirme la structure amphiphile des oléosines qui les rendent compatibles aux interfaces.

Dans le cas des polymères, les cinétiques d'adsorption dépendent de la diffusion de la molécule vers l'interface, mais aussi de l'habilité de la molécule à se déplier après adsorption[19]. Si nous extrapolons ces observations aux protéines, les protéines déployées auront une adsorption plus rapide à l'interface que les protéines globulaires avec une structure plus compacte[20]. Nos résultats suggèrent que les oléosines, qui s'adsorbent plus rapidement que la β-lactoglobuline ou la β-caséine, possèdent une structure moins globulaire.

2.5.2 Caractérisation rhéologique à l'interface huile/eau des constituants membranaires

Des mesures de tension interfaciale en mode oscillatoire[21] ont été réalisées pour déterminer les propriétés viscoélastiques des constituants membranaires à l'interface huile/eau. Ceci permet d'évaluer la rigidité que peut apporter le film constitué soit de phospholipides, d'oléosines ou de leur mélange et ainsi éviter le phénomène de coalescence.

Une déformation de l'aire de l'interface (ΔA) d'une goutte, engendre une variation de la concentration interfaciale des agents émulsifiants adsorbés à l'interface, ce qui provoque une réponse de la tension interfaciale ($\Delta\gamma$). La relation entre la déformation de l'interface et la réponse de la tension interfaciale décrit le comportement rhéologique de l'interface. Par analogie avec les corps solides, ce comportement viscoélastique provient des propriétés des tensioactifs à l'interface. Ainsi la viscoélasticité interfaciale ε est obtenue[21] :

$$\varepsilon = \varepsilon' + i\varepsilon'' \qquad \varepsilon' = |\varepsilon| \cdot \cos\phi \qquad \varepsilon'' = |\varepsilon| \cdot \sin\phi$$

où :

la partie réelle (ε') correspond à la composante élastique

la partie imaginaire (ε'') est la composante visqueuse

ϕ est l'angle de la face

$|\varepsilon|$ est le module de dilatation viscoélastique

Dans cette étude le tensiomètre Tracker a été utilisé. Les déformations de l'aire interfaciale d'une goutte pendante, après équilibre de la tension interfaciale, sont réalisées par dilatation ou par contraction du volume de façon périodique au cours du temps, en imposant une variation sinusoïdale du volume de la goutte. En même temps, les fluctuations de la tension et de l'aire interfaciale sont enregistrées à chaque seconde par l'appareil pour pouvoir ainsi calculer la viscoélasticité interfaciale ε.

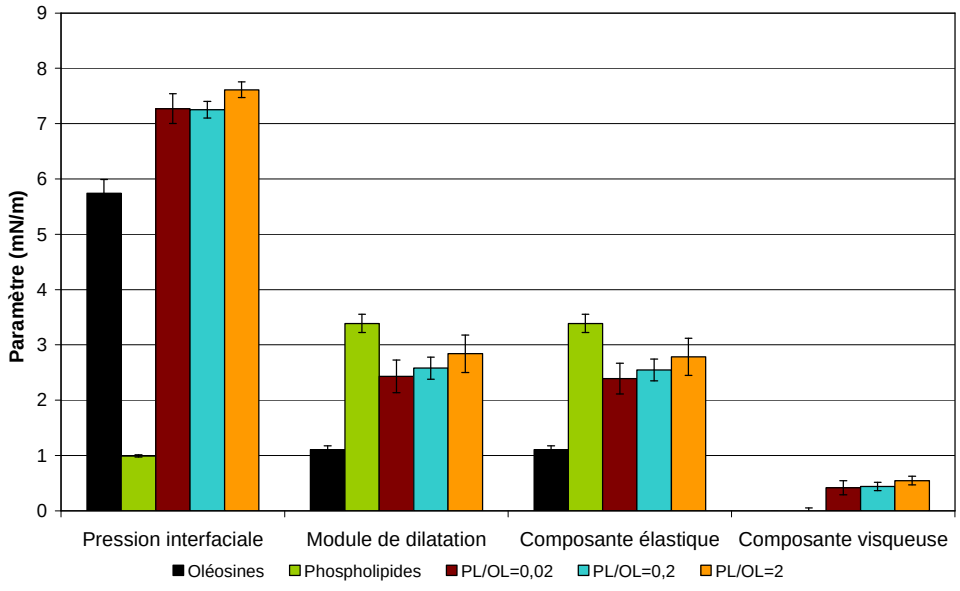
P.8 Protocole

Une goutte, contenant 0,1 g/L d'oléosines ou les différents mélanges PL/OL en gardant toujours la même teneur en oléosines, est créée avec une seringue capillaire de 250 µL (PS20, IT Concept) dans l'intérieur d'une cuve contenant 7 mL de Tris 75 mM ajusté aux pHs 5,5 et 8,5. L'aire qui entoure la goutte est déformée par fluctuations sinusoïdales de son volume avec des variations de 0,5 µL à une fréquence de 0,05 Hz. Ces fluctuations dans la tension interfaciale et l'aire sont enregistrées chaque seconde pour calculer la viscoélasticité interfaciale ε. La variation sinusoïdale est réalisée après avoir attendu l'équilibre de la tension interfaciale. Toutes les mesures ont été réalisées à 25 ºC.

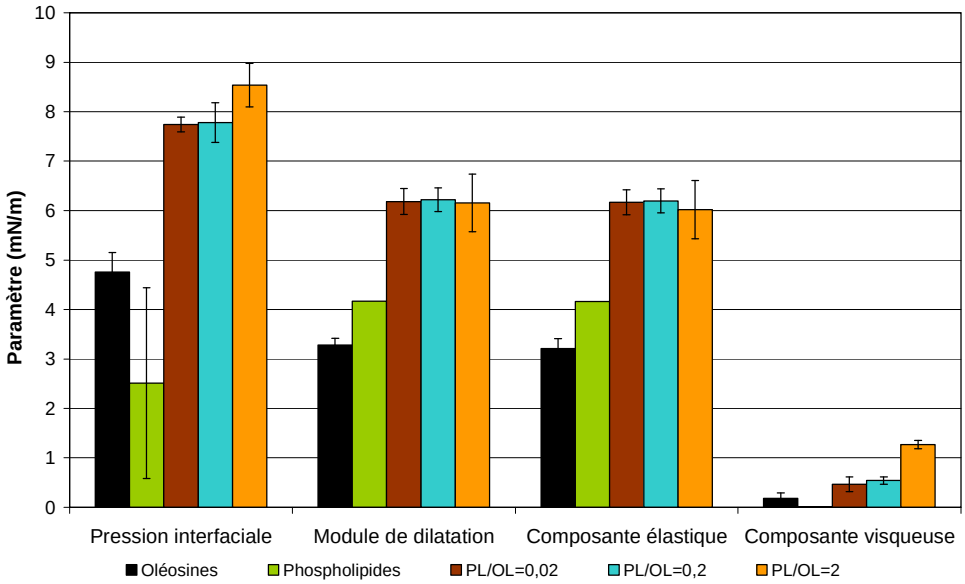
La Figure 9 affiche les pressions d'interface obtenues avant d'appliquer la déformation de l'aire interfaciale. En absence de phospholipides, les oléosines trouvent une pression interfaciale à l'équilibre de 5,8 et 4,8 mN/m à pH 8,5 et 5,5 respectivement. Pour les phospholipides tous seuls, la pression interfaciale à l'équilibre prend des valeurs de 1,0 et 2,5 mN/m aux pHs de 8,5 et 5,5 respectivement. L'ajout de phospholipides à une même concentration d'oléosines dans la phase organique, conduit à une pression interfaciale à l'équilibre supérieure, entre 7,2 et 8,5 mN/m. Ceci indique un effet synergique entre les phospholipides et les oléosines qui augmente la pression interfaciale et qui permet d'obtenir des tailles de gouttelettes plus petites lors des reconstitutions. Les valeurs de pression interfaciale dans les essais où les phospholipides et les oléosines sont présents, n'ont pas montré de différences significatives en fonction des rapports PL/OL ni du pH employé.

La Figure 9 montre aussi qu'en l'absence de phospholipides, la valeur du module de dilatation (ε) est très faible avec des valeurs de 1,1 et 3,2 mN/m pour les pHs de 8,5 et 5,5 respectivement. Ces valeurs sont plus faibles que les valeurs obtenues pour d'autres protéines, comme la β-caséine (13 mN/m) et la β-lactoglobuline (62 mN/m) dans des concentrations similaires[22], même si le système employé (paraffine/eau) est différent du notre.

Il est par fois difficile d'établir une corrélation entre l'élasticité interfaciale et la stabilité d'une émulsion. Cependant, pour les molécules comme les protéines compactes présentes à l'interface huile/eau, plus élevé est le module élastique, plus importante est la stabilité de l'interface, qui forme un film plus élastique et rigide. Notons qu'une interface rigide possède une élasticité élevée[23].



(A)



(B)

Figure 9 : Paramètres caractéristiques de l'étude rhéologique de l'interface trioléine/eau à deux pHs (A) 8,5 et B) 5,5) : la pression interfaciale à l'équilibre de l'adsorption de phospholipides, oléosines et divers rapports PL/OL, le module de dilatation, comme aussi les composantes visqueuse et élastique

Le pH de la phase aqueuse induit un effet significatif sur les propriétés rhéologiques des oléosines à l'interface. D'après les résultats obtenus, nous observons une meilleure performance des oléosines à pH 5,5 qu'à 8,5, avec un ε plus important, donc un film plus rigide. Les protéines devraient développer de meilleures performances au pH de leur point isoélectrique, puisque c'est à ce pH qu'elles présentent une répulsion moins importante.

Le point isoélectrique des oléosines varie selon l'origine et le type d'isoforme. La plupart des oléosines ont un point isoélectrique basique qui oscille entre 9 et 9,5, mais il peut être différent, neutre voire acide. White *et coll.*[24] ont déterminé un point isoélectrique global pour les oléosines de tournesol entre 5 et 6. Dans le cas du colza, Katavic *et coll.*[25] ont trouvé une valeur de 9,5. Cependant Roux[26], a constaté des variations très importantes dans le point isoélectrique tout le long de la structure de l'oléosine. Alors que le segment central hydrophobe est considéré comme non chargé, les parties terminales ont des points isoélectriques compris entre 6 et 9 avec quelques zones avec une valeur de 5.

D'après nos résultats, nous pouvons imaginer que la conformation que les oléosines adoptent à l'interface huile/eau favorise l'exposition des segments avec un point isoélectrique faible qui vont ainsi pouvoir interagir avec des segments similaires d'autres oléosines, tout en donnant de meilleures propriétés rhéologiques. Ceci est en accord avec les valeurs faibles du potentiel zêta dans les reconstitutions de corps lipidiques effectuées avec les oléosines seules à un pH de 5,5.

Quand les phospholipides sont ajoutés, ε augmente par rapport aux essais où il n'y avait que des oléosines, sans modifier le pH. Cette augmentation n'est pas en relation avec les rapports PL/OL testés. Ces résultats suggèrent l'existence d'interactions entre les molécules d'oléosines et de phospholipides en créant une sorte de complexe qui présente de meilleures propriétés rhéologiques interfaciales que chaque molécule séparément.

Quand des protéines sont présentes à une interface et qu'une déformation est appliquée à celle-ci, la déformation de l'interface n'est pas uniforme. Ainsi, l'apparition de trous est possible[27]. Cependant, si des phospholipides sont insérés à l'interface avec les oléosines, quand la déformation à l'interface aura lieu, le complexe oléosines/phospholipides agira rapidement en prévenant ainsi la déchirure du film. Ce type de comportement est inhabituel en employant des tensioactifs de petite taille moléculaire, car il est normalement observé une diminution de la viscoélasticité d'un film protéique adsorbé à l'interface due à la compétition à l'interface[28, 29].

Nous remarquons que les oléosines et les différents rapports phospholipides/oléosines testés permettent la formation d'un film ayant des propriétés plus élastiques que visqueuses pour les deux pHs. Ce qui explique la résistance à la coalescence des gouttelettes en présence

d'une teneur en oléosines élevée. De plus, aucun des phénomènes de relaxation (transferts de masse entre l'interface et la phase aqueuse et réorganisations moléculaires dans le film)[22] n'ont été observés au cours des oscillations sinusoïdales appliquées à l'aire d'interface.

2.6 Caractérisation de phospholipides et d'oléosines à l'interface air/eau

Une caractérisation du film que forment les constituants membranaires de l'oléosome à l'interface air/eau, a été réalisée pour mieux comprendre l'organisation que ces molécules adoptent à ce niveau. Cette étude a été effectuée à l'aide d'une balance de Langmuir. Cet outil permet de mesurer la pression de surface qui s'applique sur un film, en effectuant une compression du film par des barrières en téflon (Figure 10).

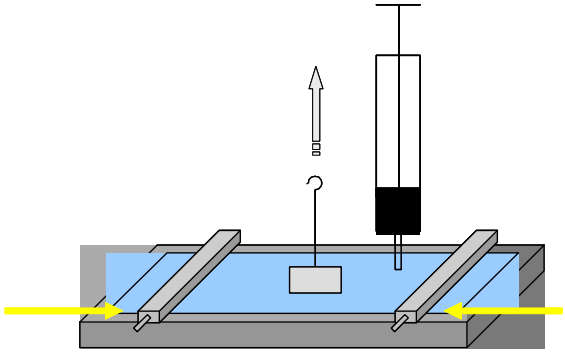


Figure 10 : Schéma du principe de la balance de Langmuir

Ces barrières sont déplacées horizontalement pour comprimer la couche, pendant qu'un capteur de pression positionné à la surface du film permet de suivre la tension de surface en fonction du temps ou en fonction de l'aire compressée. La pression de surface π (N/m) est calculée suivant l'équation ci-dessous :

$$\pi = \gamma - \gamma_c$$

où :

γ est la tension de la surface du solvant, ici l'eau à pH contrôlé

γ_c est la tension de surface en présence du produit testé.

2.6.1 Isotherme de compression

Si la température est fixée, la pression de surface dépendra uniquement de l'aire moléculaire. Dans la Figure 11 nous observons un isotherme de compression qui montre tous les états qu'un produit peut présenter en relation avec les arrangements des molécules selon l'aire moléculaire. Il existe en effet une analogie entre les arrangements qu'adoptent les molécules d'un produit sur une surface et les états de la matière. De ce fait, un état gazeux correspond au cas où les molécules sont tellement éloignées les unes des autres qu'aucune interaction n'est possible. Cet état se présente pour des aires moléculaires importantes où la pression de surface est nulle.

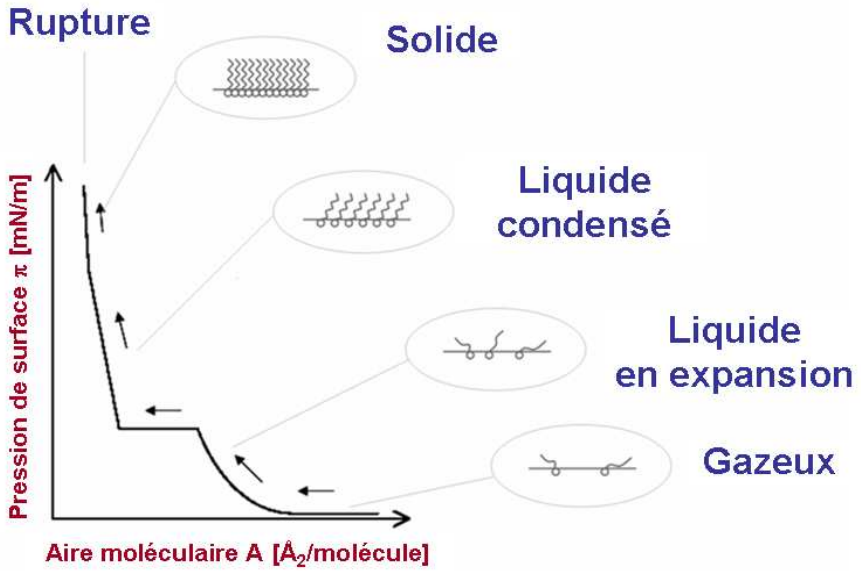


Figure 11 : Schéma qui montre l'évolution de la pression de surface (π) en fonction de la surface moléculaire (A) en montrant les différents états d'arrangement des tensioactifs en fonction de l'aire moléculaire

A mesure que l'aire diminue par compression, les molécules commencent à se rapprocher en diminuant l'aire moléculaire. En contrepartie, une augmentation de la pression de surface est générée par l'interaction entre les molécules à la surface. Ainsi nous retrouvons les états de liquide en expansion et de liquide condensé. Pour passer du premier état au deuxième, une réorganisation des molécules est nécessaire. Celle-ci est représentée dans le diagramme par un plateau au niveau duquel la pression de surface ne présente pas de variations en fonction de l'aire moléculaire, car l'énergie est absorbée par la réorganisation du film. Enfin, à de faibles aires moléculaires où la pression de surface est très importante nous parlerons d'un état solide. Après cet état, dans lequel les molécules sont les mieux arrangées

avec la plus basse tension de surface possible, nous trouverons le collapse ou rupture du film si l'aire moléculaire diminue encore.

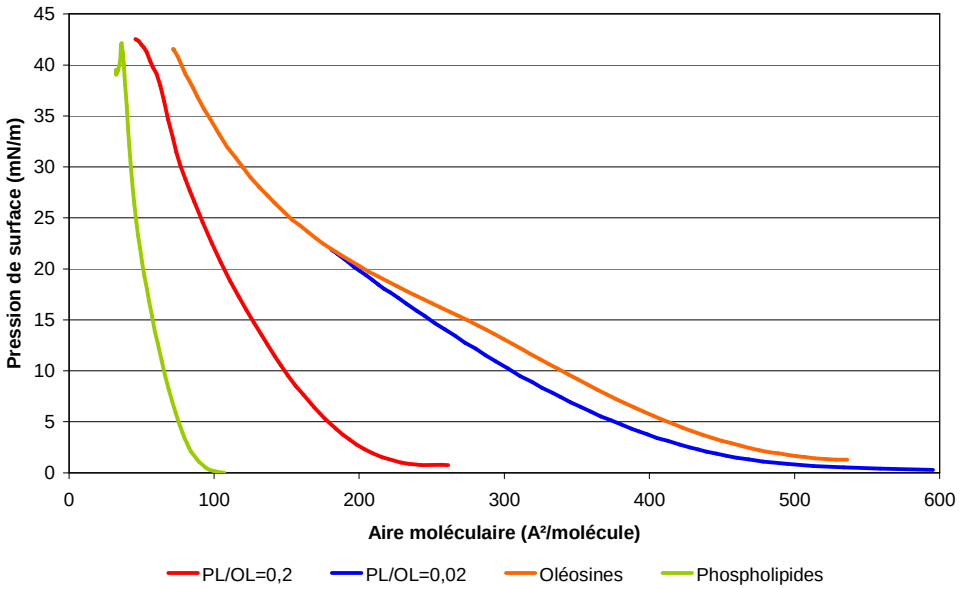
Ce type de technique a été déjà utilisé pour caractériser des peptides et leurs interactions avec des lipides membranaires[30]. Roux *et coll.*[31] ont montré avec cette technique que différentes isoformes d'oléosine d'*Arabidopsis thaliana* ont besoin d'une monocouche de phospholipides comprimée pour s'insérer à la surface. Dans le cadre de cette étude, différents isothermes de compression ont été réalisés pour observer les interactions qui existent entre les phospholipides, les oléosines et des systèmes avec différents rapports PL/OL. Pour réaliser les isothermes, deux phases aqueuses à pHs, 5,5 et 8.5 ont été préparées à l'aide de tampon Tris-HCl. Ces pHs ont été choisis pour les mêmes raisons que celles décrites au point 2.5.

P.9 ***Protocole***

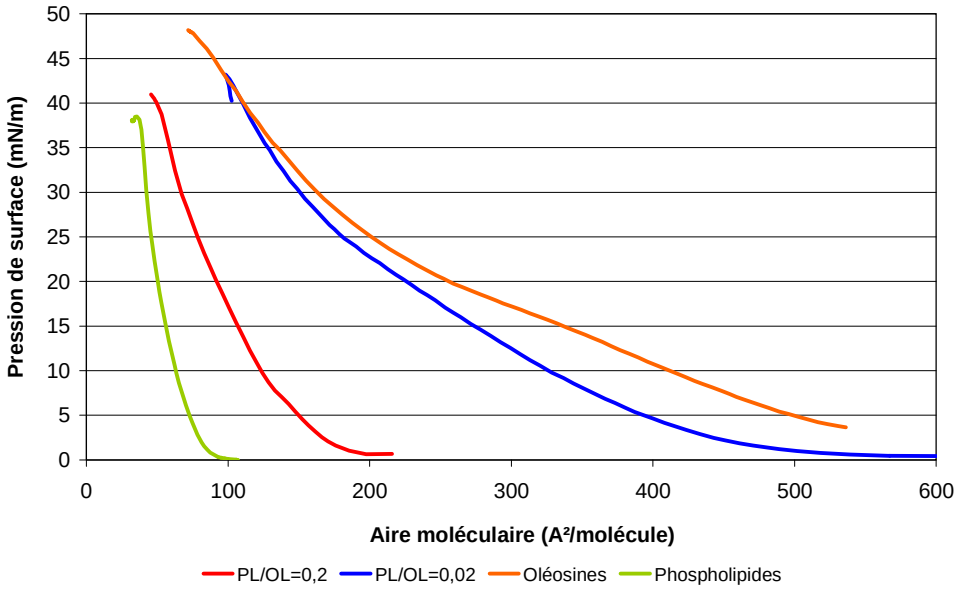
Les oléosines sont dissoutes dans de l'hexafluoroisopropanol, les phospholipides sont dissous dans un mélange chloroforme/méthanol 2/1 v/v. Le liquide, sur lequel seront ajoutées les molécules à tester, est de l'eau contenant du Tris-HCl 75 mM ajustée aux pHs 5,5 et 8,5. Cette étude a été effectuée à l'aide d'une balance de Langmuir KSV instruments (Helsinki, Finlande) équipée de deux barrières mobiles. Les aires minimales et maximales sont de 26×10^{-4} *m*^{2} *et* $2{,}5\times10^{-2}$ *m*^{2} *respectivement. Le bain est rempli du tampon et maintenu à 25 °C. Les solutions d'oléosines et de phospholipides sont ajoutées à l'aide d'une seringue micrométrique de 50 µL de façon à ajouter 3 mg/mL à la surface du tampon. La solution est dispersée en déposant des petites gouttelettes pour former une monocouche. Un temps de repos de 30 min est assuré pour permettre l'évaporation des solvants. La vitesse de compression pour chaque essai est de 0,06 nm*^{2}*/mol·min, ce qui est suffisamment lent pour permettre l'équilibre thermodynamique des protéines à l'interface.*

Dans la Figure 12 nous trouvons les isothermes qui ont été obtenus aux pHs 5,5 et 8,5 pour les oléosines, les phospholipides et les différents rapports PL/OL. Les isothermes d'oléosines pures présentent des états gazeux où la pression de surface n'est pas tout à fait nulle, en prenant des valeurs de 1,0 et 3,7 mN/m pour des pHs de 8,5 et 5,5 respectivement. Ces légères pressions peuvent être attribuées aux forces répulsives électrostatiques[32]. Une pression de surface plus importante dans le cas de l'isotherme au pH 5,5, suggère que les oléosines montrent un nombre plus important d'espèces chargées à l'interface à ce pH. Ceci

est en accord avec le point isoélectrique d'oléosines de 9,5 cité dans la littérature par Katavic *et coll.*[25].



(A)



(B)

Figure 12 : Isothermes de compression de surface en fonction de l'aire moléculaire moyenne de monocouches de différentes molécules à l'interface air/eau à 25 °C. Le pH de l'eau est contrôlé avec du tampon Tris aux pHs 8,5 (A) et 5,5 (B)

Cependant ce résultat est en contradiction avec le module viscoélastique observé à l'interface trioléine/eau pour les oléosines à pH 5,5. Ce qui se traduit par une attraction intermoléculaire plus importante. Néanmoins, nous pouvons relier cette observation aux conformations différentes qu'une protéine peut adopter à une interface huile/eau et une interface air/eau[33]. Aux deux pHs, les isothermes en présence d'oléosines présentent une

inflexion autour de 15 mN/m, ce qui correspond à une réorganisation moléculaire[34]. A mesure que les films d'oléosines sont compressés, la pression de surface augmente pour atteindre des valeurs maximales autour de 48 et 42 mN/m au pH de 5,5 et 8,5 respectivement.

Les isothermes avec le mélange PL/OL=0.02 conservent le même profil qu'avec les oléosines pures. Une faible quantité de phospholipides suffit à éliminer les forces électrostatiques entre les oléosines à l'état gazeux en diminuant la pression de surface à 0 mN/m. En même temps, cet ajout de phospholipides a aussi un effet sur la pression de surface de transition, qui est maintenant de 20 mN/m, et sur la pression de surface pour la rupture du film à 43 mN/m. Toutes ces différences montrent bien que les phospholipides et les oléosines ont un impact mutuel en changeant l'organisation présentée par ces individus isolés à l'interface. Ceci est concordant avec les résultats concernant leur temps d'adsorption et leur comportement rhéologique à l'interface. L'augmentation du rapport PL/OL à 0,2 change la forme des isothermes, ce qui met en évidence l'effet qu'ont les phospholipides sur l'organisation des oléosines à l'interface. Dans le cas des isothermes obtenus avec les phospholipides seuls, aucun état de transition moléculaire n'est observé.

2.6.2 Effet synergique entre oléosines et phospholipides

Un des buts de cette étude est de mettre en évidence l'effet synergique entre les oléosines et les phospholipides. Pour cela, une analyse des aires moléculaires a été effectuée. Dans le cas d'un comportement idéal, pour les systèmes binaires à l'interface à une pression de surface donnée, l'aire moléculaire moyenne A_{id} est définie comme :

$$A_{id} = X_1 A_1 + (1 - X_1) A_2$$

où :

A est l'aire moléculaire moyenne

X est le rapport molaire

1 et 2 les composants à l'interface

Dans notre cas 1 et 2 sont les phospholipides et les oléosines. En effet, cette aire correspond à la somme pondérée des aires moléculaires des composants isolés[34]. Si des déviations sont observées dans les aires moléculaires moyennes d'un système binaire, elles

seront dues aux interactions entre molécules de natures différentes[30].

Dans la Figure 13 nous observons les corrélations qui existent entre les aires moléculaires moyennes et les rapports moléculaires pour le système binaire phospholipides/oléosines à une pression de surface de 20 mN/m. La ligne pointillée correspond aux valeurs prédites pour A_{id} d'après son équation écrite ci-dessus.

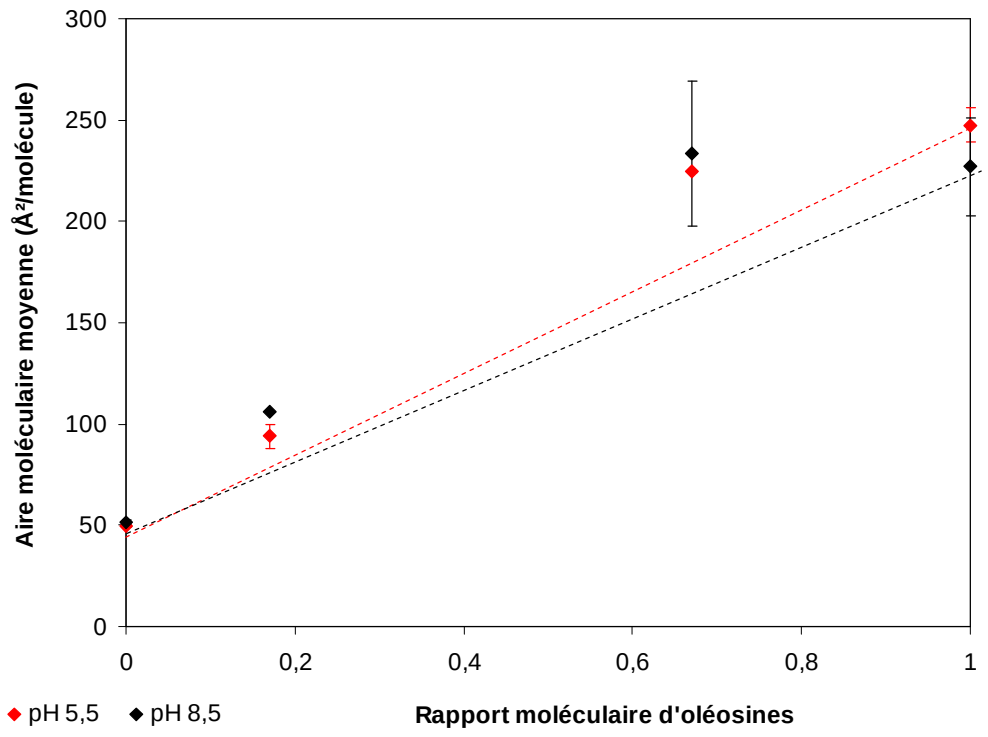


Figure 13 : Aire moléculaire moyenne de monocouches, contenant différents rapports de phospholipides/oléosines, en fonction de la proportion molaire d'oléosines à pH 5,5 et 8,5. Les deux lignes représentent les valeurs correspondant à la règle d'addition pour les deux pHs

Les aires moléculaires observées pour les systèmes binaires contenant des rapports de PL/OL=0,2 (X_1=0,17) et de PL/OL=0,02 (X_1=0,67) à une pression de surface de 20 mN/m et aux deux pH testés, présentent une déviation positive par rapport aux valeurs d'aire moléculaire calculées par l'expression citée précédemment. Ceci s'explique par une interaction également positive entre les phospholipides et les oléosines. Des interactions électrostatiques entre les acides aminés basiques et les charges négatives des phospholipides, peuvent être à l'origine de ces interactions.

2.7 Conclusions

Cette étude fondamentale a contribué à l'élucidation du rôle de chaque constituant majeur des oléosomes dans la stabilité de ces derniers en milieux aqueux. C'est grâce à la caractérisation de chaque constituant séparément et à la reconstitution de corps lipidiques en employant différents rapports d'agents émulsifiants que nous avons pu observer leurs fonctions et interactions.

Les phospholipides ont confirmé leur très bon pouvoir émulsifiant grâce aux forces électrostatiques, pendant que les oléosines ont montré des bonnes propriétés rhéologiques à l'interface. D'autre part, la présence de constituants non membranaires ne semble pas contribuer positivement à la stabilité d'oléosomes en milieu aqueux à pH natif.

La caractérisation rhéologique des oléosines et phospholipides a permis d'observer l'influence que les phospholipides ont dans le comportement des oléosines à l'interface. Un effet synergique a été observé lorsque ces deux molécules ont été présentes. Nous pensons que celui-ci est dû aux interactions électrostatiques entre ces deux molécules.

2.8 Références bibliographiques

1. Patel, N., Schmid, U., and Lawrence, M.J., *Phospholipid-Based Microemulsions Suitable for Use in Foods.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2006**. 54(20): p. 7817-7824.

2. Harada, T., Kashihara, K., and Nio, N., *Oleosin/phospholipid complexes suitable for use as emulsion stabilizers, and process for producing the same*. **2002**, (Ajinomoto Co., Inc., Japan). WO 2002026788. p. 29.

3. Tzen, J.T. and Huang, A.H., *Surface structure and properties of plant seed oil bodies.* The Journal of Cell Biology, **1992**. 117(2): p. 327-335.

4. Li, M., Smith, L.J., Clark, D.C., Wilson, R., and Murphy, D.J., *Secondary structures of a new class of lipid body proteins from oilseeds.* The Journal of Biological Chemistry, **1992**. 267(12): p. 8245-8253.

5. Bradstreet, R.B., *Kjeldahl Method for Organic Nitrogen.* Analytical Chemistry, **2002**. 26(1): p. 185-187.

6. Moore, S. and Stein, W., *Aminoacid determination, methods and techniques.* Journal of Biological Chemistry, **1951**. 192: p. 663-670.

7. Murphy, D.J., Keen, J.N., O'Sullivan, J.N., Au, D.M.Y., Edwards, E.-W., Jackson, P.J., Cummins, I., Gibbons, T., Shaw, C.H., and Ryan, A.J., *A class of amphipathic proteins associated with lipid storage bodies in plants. Possible similarities with animal serum apolipoproteins.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, **1991**. 1088(1): p. 86-94.

8. Lee, K. and Huang, A.H.C., *Genomic Nucleotide Sequence of a Brassica napus 20-Kilodalton Oleosin Gene.* Plant Physiology, **1991**. 96(4): p. 1395-1397.

9. Shaikh, N.A., *Assessment of Various Techniques for the Quantitative Extraction of Lysophospholipids from Myocardial Tissues.* Analytical Biochemistry, **1994**. 216(2): p. 313-321.

10. Simpson, T. and Nakamura, L., *Phospholipid degradation in membranes of isolated soybean lipid bodies.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1989**. 66(8): p. 1093-1096.

11. Novotná, Z., Kás, J., Daussant, J., Sajdok, J., and Valentová, O., *Purification and characterisation of rape seed phospholipase D.* Plant Physiology and Biochemistry, **1999**. 37(7-8): p. 531-537.

12. Gaonkar, A.G., *Interfacial tensions of vegetable oil/water systems: effect of oil purification.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1989**. 66(8): p. 1090-1092.

13. Israelachvili, J.N., *Intermolecular and surface forces*. 2nd ed. **1992**, London: Academic Press, Inc. p. 213-259.

14. Moncelli, M.R., Becucci, L., and Guidelli, R., *The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes.* Biophysical Journal, **1994**. 66(6): p. 1969-1980.

15. Tsui, F.C., Ojcius, D.M., and Hubbell, W.L., *The intrinsic pKa values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host bilayers.* Biophysical Journal, **1986**. 49(2): p. 459-468.

16. Stanislav, S.D., Johan, S., and Oystein, S., *An experimental and theoretical approach to the dynamic behavior of emulsions*, in *Emulsions and Emulsion stability*. **2006**, CRC Taylor and Francis. p. 21-107.

17. Fang, Y. and Dalgleish, D.G., *Casein adsorption on the surfaces of oil-in-water emulsions modified by lecithin.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **1993**. 1(6): p. 357-364.

18. Murray, B.S. and Cros, L., *Adsorption of [beta]-lactoglobulin and [beta]-casein to metal surfaces and their removal by a non-ionic surfactant, as monitored via a quartz crystal microbalance.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **1998**. 10(4): p. 227-241.

19. Dukhin, S.S., Kretzschmar, G., Miller, R., and Editors, *Dynamics of Adsorption at Liquid Interfaces*. Studies in Interface Science. Vol. 1. **1995**. 604 pp.

20. Makievski, A.V., Miller, R., Fainerman, V.B., Kragel, J., and Wustneck, R., *Adsorption of proteins at the gas-liquid and oil-water interfaces as studied by the pendant drop method.* Journal of Royal Society of Chemistry, **1999**. 227(Food Emulsions and Foams): p. 269-284.

21. Benjamins, J., Cagna, A., and Lucassen-Reynders, E.H., *Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered by proteins.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **1996**. 114: p. 245-254.

22. Williams, A. and Prins, A., *Comparison of the dilational behaviour of adsorbed milk proteins at the air-water and oil-water interfaces.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **1996**. 114: p. 267-275.

23. Yarranton, H.W., Sztukowski, D.M., and Urrutia, P., *Effect of interfacial rheology on model emulsion coalescence: I. Interfacial rheology.* Journal of Colloid and Interface Science, **2007**. 310(1): p. 246-252.

24. White, D.A., Fisk, I.D., Mitchell, J.R., Wolf, B., Hill, S.E., and Gray, D.A., *Sunflower-seed oil body emulsions: Rheology and stability assessment of a natural emulsion.* Food Hydrocolloids, **2008**. 22(7): p. 1224-1232.

25. Katavic, V., Agrawal Ganesh, K., Hajduch, M., Harris Stefan, L., and Thelen Jay, J., *Protein and lipid composition analysis of oil bodies from two Brassica napus cultivars.* Proteomics, **2006**. 6(16): p. 4586-98.

26. Roux, E.M.A., *Les oléosines, de nouveaux émulsifiants d'origine végétale. Comparaison des globules lipidiques extraits de végétaux (A. thaliana) et de levures (Y. lipolytica)*, in *UMR de Chimie Biologique INRA/INA P-G*. **2003**, Institut National Agronomique: Paris-Grignon. p. 1-199.

27. Murray, B.S. and Dickinson, E., *Interfacial rheology and the dynamic properties of adsorbed films of food proteins and surfactants.* Food Science and Technology International, Tokyo, **1996**. 2(3): p. 131-145.

28. Walstra, P., *Principles of emulsion formation.* Chemical Engineering Science, **1993**. 48(2): p. 333-49.

29. Wilde, P.J., *Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour.* Current Opinion in Colloid & Interface Science, **2000**. 5(3-4): p. 176-181.

30. Maget-Dana, R., *The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, **1999**. 1462(1-2): p. 109-140.

31. Roux, E., Baumberger, S., Axelos, M.A.V., and Chardot, T., *Oleosins of Arabidopsis thaliana: Expression in Escherichia coli, Purification, and Functional Properties.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**. 52(16): p. 5245-5249.

32. Marsh, D., *Lateral pressure in membranes.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes, **1996**. 1286(3): p. 183-223.

33. Miller, R. *Proteins at liquid/liquid interface-adsorption and rheological properties*. in *Second World Congress on Emulsion*. **1997**. EDS, Paris.

34. Gaines, G.L., Jr., *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, ed. Wiley. **1966**, New York. p. 386.

Chapitre 3

Procédé Intégré :

Approche Générique

« in one pot »

3.1 Graines oléoprotéagineuses sélectionnées 101
3.1.1 Analyse des graines 102
3.2 Procédé Intégré 107
3.2.1 Broyage des graines par voie aqueuse 108
3.2.2 Mécanisme de libération des lipides à partir de la graine 122
3.2.3 Séparation des phases après broyage 124
3.3 Analyses des différentes phases obtenues après libération des lipides endogènes par le procédé intégré 127
3.3.1 Stabilité de l'émulsion issue du procédé intégré 131
3.4 Séchage de l'émulsion issue du Procédé Intégré 133
3.4.1 Technologies de séchage 134
3.4.2 Comparaison entre la lyophilisation et l'atomisation dans le séchage d'émulsions huile dans l'eau 137
3.4.3 Amélioration de la réhydratation de l'émulsion sèche 144
3.5 Emulsion issue du procédé intégré comme biolubrifiant 149
3.5.1 Caractérisation de produits 150
3.5.2 Toxicité et Biodégradabilité 152
3.5.3 Performances tribologiques de la formulation 154
3.6 Conclusions 156
3.7 Références bibliographiques 157

CHAPITRE 3

Procédé Intégré : Approche Générique « in one pot »

Ce troisième chapitre présentera les travaux, menés durant cette thèse sur le développement d'un procédé permettant l'obtention d'émulsions huile dans l'eau à partir de graines oléoprotéagineuses entières. Nous commencerons par une caractérisation des graines entières qui seront utilisées comme matière première. Ensuite, la mise au point d'un protocole permettant d'atteindre notre objectif sera réalisée avec la graine de colza (modèle). Enfin, l'analyse et la caractérisation des produits obtenus seront présentées.

3.1 Graines oléoprotéagineuses sélectionnées

Au cours de ces travaux, nous avons travaillé plus particulièrement avec la graine de colza parmi toutes les graines oléoprotéagineuses. Elle est la graine modèle au sein de notre équipe de recherche pour sa teneur importante en acide oléique, sa géométrie simple et une production prometteuse dans la Région Midi-Pyrénées autant qu'en France ; elle a été choisie avec le tournesol, comme matière première pour le procédé intégré développé dans les projets IBIOLAB et OLEOMA. Ce dernier fait intervenir aussi les graines de lin et de soja.

Figure 1 Images de différentes plantes à graines oléoprotéagineuses : **1.** Colza, **2.** Tournesol, **3.** Lin **4.** Soja

En plus, le fait de travailler avec des graines oléoprotéagineuses qui présentent des géométries et des compositions différentes nous permettra d'observer les possibles verrous technologiques ainsi que les limites du procédé en lui-même. Les Figures 1 et 2 présentent ces différentes plantes oléoprotéagineuses ainsi les graines qui leurs sont associées.

Figure 2 : Images de différentes graines oléoprotéagineuses : **1.** Colza, **2.** Tournesol décortiqué, **3.** Lin **4.** Soja

3.1.1 Analyse des graines

Tout d'abord, nous avons analysé les graines choisies. Le Tableau 1 fournit des éléments caractéristiques de ces graines comme l'espèce, le fournisseur, la variété ou encore leur taille. Il affiche également, pour chaque graine, la composition en pourcentage massique des principaux constituants (eau, protéines, lipides, fibres et minéraux).

3.1.1.1 Morphologie des graines

A la lecture des données du Tableau 1, nous pouvons faire quelques commentaires sur les aspects physiques. La variété Kosto de l'espèce *Brassica napus* L. (colza) présente la plus petite taille avec une forme sphérique de 2,0 mm de diamètre. Les variétés hiver et printemps de l'espèce *Linum usitatissimum* L. (lin) présentent aussi une petite taille, mais sous la forme d'une amande avec une dimension de 4,6 mm en longueur. En ce qui concerne l'espèce *Helianthus annuus* L. (tournesol), les dimensions sont plus importantes que celles du colza et du lin. Avec une longueur maximale de 10,8 mm, cette graine présente aussi la forme d'une amande. En dernier, l'espèce *Glycina max* (L.) (soja), représenté sous une forme sphérique avec un diamètre, plus grand que celui du colza, égal à 7,5 mm. Ainsi, le choix de ces quatre espèces nous offre deux géométries différentes avec deux tailles différentes. Ceci nous permettra d'évaluer les besoins technologiques en fonction de la morphologie de la graine. Il est possible d'observer la densité des différentes graines dans ce même Tableau 1. La graine

de tournesol possède la densité la moins importante, contrairement à celle de la graine de soja qui est la plus élevée. Les graines de colza et de lin présentent des densités intermédiaires. Ces valeurs sont un reflet de leur géométrie mais aussi de leur propre composition, ce que nous pouvons associer à une dureté de la graine. Ainsi, en comparaison des autres graines, nous aurons une graine de soja plus difficile à déstructurer et une graine de tournesol très légère (dû à une haute teneur en fibres dans sa coque) qui aura plus de mal à s'incorporer dans l'eau.

Tableau 1 : Caractéristiques et teneurs des constituants majeurs et mineurs des graines oléoprotéagineuses entières

Graine	**Colza**	**Tournesol**	**Lin**		**Soja**
Espèce	*Brassica napus* L.	*Helianthus annuus* L.	*Linum usitatissimum* L.		*Glycina max* (L.)
Fournisseur	Momont	Toulousaine de Céréales	Linea		Toulousaine de Céréales
Variété ou Lot	Kosto	T-135/T0/P05	Hiver (Alaska)	Printemps (Niagara)	Soja
Densité (g/cm^3)*	650-720	400-450	680-720		750-780
Forme					
Longueur max (mm)	2,0 ± 0,1	10,8 ± 0,2	4,7 ± 0,2	5,0 ± 0,3	7,5 ± 0,4
% Humidité	7,7 ± 0,1	5,8 ± 0,4	8,8 ± 0,1	8,2 ± 0,1	13,3 ± 0,2
% Cendres	3,7 ± 1.8	3,4 ± 0,2	2,6 ± 1,2	3,5 ± 0,9	4,8 ± 1,3
% Protéines	21,7 ± 0,2	17,8 ± 0,7	22,9 ± 2,0	28,8 ± 0,2	41,5 ± 2,5
% Lipides	47,0 ± 1,9	45,9 ± 0,6	41,3 ± 0,3	42,7 ± 0,7	18,9 ± 0,1
% Phosphore[ɤ]	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1
Stérols (mg/100 g de graines)	407,6 ± 7,2	210,6 ± 4,4	181,9 ± 1,4	142,5 ± 0,2	65,4 ± 0,3
Tocophérols (mg/100 g de lipides)[¥]	62,5 ± 2,3	63,4 ± 2,2	58,9 ± 3,5		179,8 ± 10,0
% Phospholipides*	1,5	0,5	1,5		1,5
% Hydrates de carbone*	16	9	24		9
% Coques*	15	25	N.D.		7
% Fibres	7,3 ± 0,9	24,1 ± 0,5	7,9 ± 0,5	6,3 ± 0,7	11,6 ± 1,1

[ɤ] Pourcentage en phosphore total
N.D. Non Disponible
* Bockisch[1]
[¥] Tuberoso *et coll.*[2]

3.1.1.2 Constituants des graines

Si nous regardons maintenant la composition des graines entières, nous remarquons que les teneurs en eau et en cendres (matière non organique) varient légèrement entre les quatre espèces, mais sans grands écarts. Cependant, les teneurs en lipides et en protéines varient en fonction de l'espèce. D'une part nous trouvons que c'est le soja qui présente la quantité de protéines la plus importante avec 41,5 %, tandis que le reste des espèces a des valeurs entre 17 et 29 %. D'autre part, les espèces ici présentes ont des teneurs en lipides qui oscillent entre 41 et 47 %, sauf dans le cas du soja qui en contient à peine 18,9 %. Les teneurs en hydrates de carbone des différentes graines obtenus dans la littérature sont également présentées. La teneur de ces constituants chez la graine de lin est remarquable. Elle représente presque 1/4 de la graine entière, à la différence du colza qui en possède 16 % ou le tournesol et le soja avec uniquement 9 %. Maintenant, si nous observons la composition des coques et fibres dans les graines, nous observons que leurs valeurs sont très similaires pour la graine de tournesol. Ainsi, la coque, constituée principalement de fibres, constitue 1/4 de la graine entière, ce qui peut générer des problèmes dans le broyage dû à la bonne résistance mécanique qu'offrent ces constituants.

Concernant la fraction lipidique, même si elle est majoritairement constituée de triglycérides, elle contient d'autres molécules qui sont souvent nommées comme constituants mineurs. Parmi ces molécules, les phospholipides, phytostérols et tocophérols ont des teneurs indiquées sur le même Tableau 1. Malgré la faible teneur en ces molécules, nous pouvons apprécier quelques différences entre les espèces. La teneur en tocophérol de la graine de soja semble très importante vis-à-vis des autres graines. Cependant cette quantité est normalisée par la quantité de lipides, qui dans le cas du soja, n'est pas si importante. De la même façon, les teneurs en phospholipides sont reliées à la teneur en lipides, très importante chez le soja cette teneur est égale à celle du colza ou du lin.

Toujours dans le Tableau 1, nous observons également la teneur en phosphore qui englobe la teneur apportée par les phospholipides et le phosphore minéral. Cette teneur est pratiquement constante dans toutes les graines. En ce qui concerne la teneur en phytostérols dans les graines, c'est le colza qui en contient le plus, suivi par le tournesol, le lin et le soja. Le profil des stérols chez les différentes graines a été aussi réalisé (Tableau 2).

Tableau 2 : Teneur en stérols en mg/100g de graines dans les différentes graines

Graines	Colza	Tournesol	Lin Hiver	Lin Printemps	Soja
Cholestérol	-	-	1,9	1,1	0,6
Brassicastérol	63,6	-	-	-	-
24 Méthylène Cholestérol	-	-	3,3	2,9	-
Campestérol	134,4	26,2	46,9	38,9	16,2
Stigmastérol	2,0	20,4	6,5	13,2	11,1
β Sitostérol	198,1	126,3	96,0	67,3	34,6
Δ5 Avénastérol	9,5	7,8	32,5	23,1	1,5
Δ7 Stigmastenol	-	21,8	-	-	0,6
Δ7 Avénastérol	-	8,0	-	-	0,7

Nous trouvons des répartitions différentes et spécifiques à chaque espèce ; cependant le β sitostérol est majoritaire pour toutes les espèces. Nous remarquons des molécules caractéristiques ou majoritaires parmi les stérols de chaque graine. C'est le cas du brassicastérol qui est présent uniquement chez le colza ou le 24 méthylène cholestérol chez le lin. Cette famille de molécules est utilisée, à l'état natif, en nutrition sur le marché des aliments fonctionnels[3], ou, à l'état modifié, dans des produits pharmaceutiques ou cosmétiques en tant qu'émollients, émulsifiants ou dispersants[4]. Concernant le tournesol, les stérols sont principalement concentrés dans la coque avec 28 % de la teneur totale de la graine[5].

3.1.1.3 Profil d'acides gras des graines

Nous avons aussi analysé le profil d'acides gras des lipides dans chaque graine. Les proportions en pourcentage massique sont indiquées dans le Tableau 3. Nous constatons une forte teneur en acides gras C_{18} insaturés dans toutes les fractions lipidiques des graines, ce qui rend leurs huiles liquides à une température ambiante. Nous observons aussi que chaque espèce a un profil caractéristique.

Les différences qui peuvent exister entre ces profils et les profils présentés dans le Chapitre 1 sont dues aux améliorations génétiques provenant des sélections qui sont faites dans chaque espèce pour donner place à des variétés avec un appauvrissement ou

enrichissement en un constituant donné.

Tableau 3 : Profil d'acides gras de la fraction lipidique de différentes graines

Graines	Colza	Amandes Tournesol	Lin Hiver	Lin Printemps	Soja
Acide Palmitique C16:0	~5 %	~3,5 %	5,4 %	4,7 %	10,8 %
Acide Palmitoléique C16:1n7	~0,2 %	-	-	-	-
Acide Stéarique C18:0	1,5-2 %	~3 %	3,2 %	5,3 %	4,3 %
Acide Oléique C18:1 n9	60-62 %	86-87 %	14,1 %	20,2 %	19,3 %
Acide Linoléique C18:2n6	20-21 %	~5,5 %	15,9 %	15,7 %	55,9 %
Acide Linolénique C18:3n3	8-10 %	-	61,4 %	54,1 %	9,4 %
Acide Arachidique C20:0	~0,5 %	~0,2 %	0,0 %	0,0 %	0,3 %
Acide Gadoléique C20:1n11	1-1,5 %	~0,2 %	-	-	-
Acide Behenique C22:0	0,5-1 %	<1 %	-	-	-
Ratio saturé / insaturé	**0,09**	**0,08**	**0,09**	**0,11**	**0,18**
Ratio monoinsaturé / polyinsaturé	**2,13**	**15,76**	**0,18**	**0,29**	**0,30**

Si nous prenons en considération le nombre d'insaturations que présente l'acide gras C_{18}, toujours majoritaire, nous pouvons classer les graines en deux groupes : en premier le groupe de graines à huile monoinsaturée, dans lequel nous trouvons le colza et le tournesol qui ont des teneurs supérieures à 60 % en acide oléique. Le deuxième groupe, formé par les deux variétés de lin et le soja est celui des graines à huile polyinsaturée. Le lin a en effet une majorité d'acide linolénique tandis que c'est l'acide linoléique pour le soja. Nous trouvons dans l'avant-dernière ligne du tableau le rapport entre la totalité des acides gras saturés et ceux insaturés. Ce rapport nous permet de constater que la quantité d'acides gras saturés est largement inférieure à celle des acides gras insaturés. La dernière ligne représente le rapport qui existe entre les acides gras mono et polyinsaturés. Ainsi nous constatons que la graine de tournesol a une forte teneur en acides monoinsaturés tandis que les graines de lin et de soja sont constituées essentiellement d'acides gras polyinsaturés. Selon ce rapport, la graine de colza contiendrait deux fois plus d'acides monoinsaturés que de polyinsaturés.

3.2 Procédé Intégré

Le procédé intégré a pour but de libérer les lipides endogènes des graines oléoprotéagineuses sous forme d'émulsions stabilisées par des molécules tensioactives qui se trouvent naturellement dans ces mêmes graines. Cette démarche expérimentale fait appel aux méthodes physiques, mécaniques et chimiques pouvant permettre une séparation du système aqueux hétérogène et donner lieu en principe à trois phases : une phase solide (culot), une phase aqueuse et une émulsion riche en lipides (Figure 3).

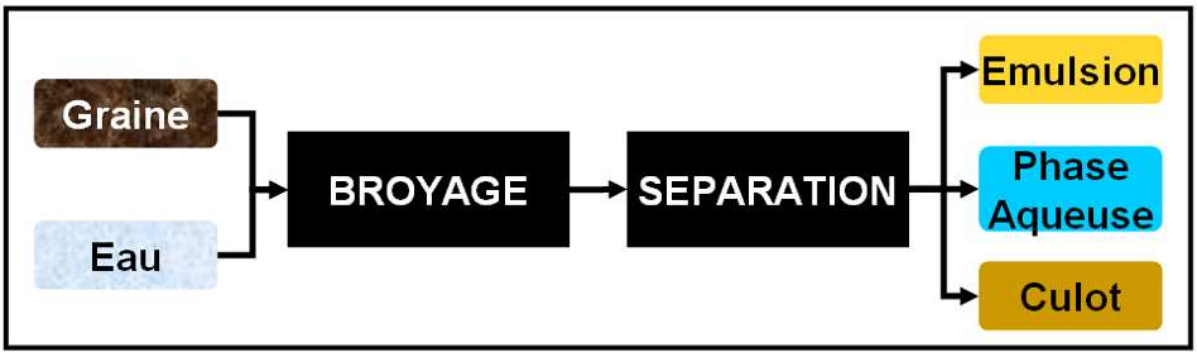


Figure 3 : Diagramme du procédé intégré

Pour rendre notre objectif possible, le procédé intégré implique des technologies de déstructuration de façon à libérer les corps lipidiques emprisonnés dans les graines, ainsi que des technologies de séparation permettant d'isoler ces structures lipidiques dans une fraction. Ceci, comme le schéma de la Figure 3 l'illustre, se fera grâce à un broyage et à une séparation des phases.

Si nous voulons conserver la conformation des lipides, c'est-à-dire, sous forme d'oléosomes, il faudra utiliser des outils respectueux de ces structures, en travaillant à des conditions opératoires douces. Ceci doit se faire sans jamais perdre de vue l'impact environnemental que de telles technologies vont avoir au moment de les industrialiser, si nous voulons travailler dans une optique de développement durable. Ainsi toute opération doit respecter les principes de la chimie verte.

C'est pourquoi nous proposons une démarche dans laquelle les étapes de transformation se font *in planta* pour réduire le nombre d'opérations. Ceci avec l'aide de technologies qui opèrent à températures basses pour réduire la consommation énergétique. En

même temps, les constituants présents dans les graines sont valorisés de façon à réduire le nombre d'entrants. De plus, en employant pratiquement que de l'eau en plus des graines oléoprotéagineuses, nous minimisons les risques de produire des effets néfastes pour l'environnement.

3.2.1.1 Évolution et sélection des outils lors du broyage

Les recherches menées au sein du laboratoire ces dernières années ont permis un développement technologique du broyage des graines en présence d'eau, de façon à augmenter son efficacité, en augmentant par exemple les rendements d'extraction ou en diminuant le temps de broyage.

Les travaux au cours de cette thèse ont été menés avec l'objectif de pouvoir diversifier les matrices à traiter. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler avec différentes matrices, telles que les graines de colza, de tournesol, de soja et de lin, qui présentent des géométries et des compositions différentes, afin d'opter pour les instruments les plus polyvalents possibles lors du développement de ce procédé. Néanmoins, toute cette première partie, consacrée au développement du procédé, sera présentée en employant notre graine modèle : la graine de colza, qui présente aussi la géométrie la plus petite et la plus simple.

3.2.1 Broyage des graines par voie aqueuse

Le broyage est l'opération par laquelle on cherche à réduire la taille de particules solides en augmentant leur surface spécifique. Il est le résultat de l'action d'un champ de contraintes engendré par des forces de contact, telles que la compression, le cisaillement, la torsion, la flexion, l'attrition et même la traction[6]. Ce champ varie avec l'intensité et la distribution des forces, avec la nature, la forme et les discontinuités structurales du solide comme aussi avec la dynamique des déformations. Le broyage cherche toujours à satisfaire des exigences relatives à des utilisations ultérieures et vise, généralement, au moins une parmi les finalités suivantes :

- Réduire les dimensions, soit pour faciliter le conditionnement ou l'utilisation, soit pour libérer les constituants avant une opération séparative.

- Augmenter la réactivité vis-à-vis de processus dont la cinétique dépend de la finesse ou du degré de désordre.
- Homogénéiser et créer ainsi des mélanges ou des dilutions solides.
- Conférer des spécifications de forme, de texture ou de distribution granulaire.
- Modifier la fonctionnalité, soit sous l'effet de l'activation mécanochimique, soit en profitant de la création de nouvelles surfaces pour y implanter les groupes fonctionnels désirés.

Dans le cas du procédé intégré, nous nous intéressons au broyage avec le but de libérer les corps lipidiques qui se trouvent à l'intérieur de la graine. Du fait que nous voulons former des émulsions natives avec ces corps lipidiques, le broyage en présence d'eau semble être avantageux. L'eau, au cours des contraintes mécaniques, favorisera en effet la libération de ces structures lipidiques. Ceci se fait grâce à la monocouche de phospholipides et les protéines qui entourent les lipides en exposant leurs groupes hydrophiles. De plus, cette eau contribuera à la déstructuration des parois cellulaires des graines, par un meilleur transfert des contraintes générées par les outils. De plus, ce choix élimine aussi une étape supplémentaire qui serait la mise en contact d'un broyat sec de graines avec l'eau.

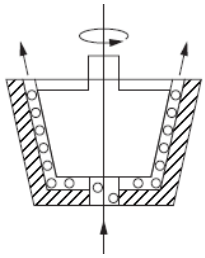
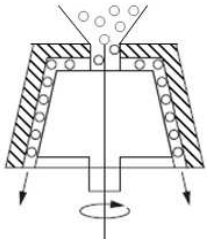
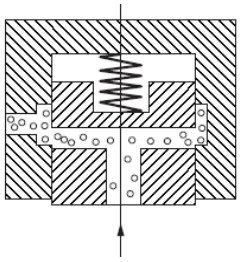
3.2.1.1 Equipement pour la déstructuration des graines en présence d'eau

Pour réaliser cette déstructuration de graines en présence d'eau, nous avons à notre disposition différents outils qui permettent de travailler à une échelle de laboratoire. Ces outils, avec des principes d'action différents, permettront de varier la qualité du broyage, ou même de conditionner leur emploi à des modes opératoires différents. Les équipements auxquels nous faisons référence sont décrits dans le Tableau 4.

Ce tableau illustre quelques caractéristiques des outils pour la déstructuration des graines. Le mélangeur rotor/stator à haut cisaillement, qui semble apporter différents effets avec des actions de mélange et de cisaillement amenées par la tête de travail, permet la déstructuration de solides de différentes géométries en modifiant le stator de la tête de travail. De son coté, le moulin colloïdal, qui est aussi constitué d'un rotor/stator, fragmente par des forces de coupe importantes générées entre rotor et stator.

Dans le cas de l'homogénéisateur haute pression, une pompe à pistons plongeurs contraint le fluide à passer à travers un orifice réglable. Au passage de cet obstacle, le fluide va subir différentes contraintes, telles que la turbulence, la cavitation et le cisaillement qui vont générer la déstructuration des particules solides en même temps que la fragmentation des gouttelettes de la phase discontinue de l'émulsion. La pression appliquée au fluide varie en fonction du diamètre de l'orifice. Ainsi, plus l'orifice est petit, plus la pression est élevée.

Tableau 4 : Description des outils employés pour la déstructuration des graines à l'échelle laboratoire (* indique le mode opératoire en option avec certaines adaptations)

Equipement	Action	Mode opératoire	Limite physique	Capacité	Schéma
Mélangeur Rotor/stator	- Mélangeur - Dispersant - Emulsifiant - Désintégrateur - Homogénéisateur	Continu* Batch	Géométrie de la tête de travail	<1200 L/h 1 mL-12 L	
Moulin Colloïdal	- Désintégrateur - Dispersant - Homogénéisateur	Continu	Ecart entre le rotor et stator	<1000 L/h >1 L	
Homogénéisateur haute pression	- Emulsifiant - Désintégrateur - Homogénéisateur	Continu	Diamètre de l'orifice de circulation	~22 L/h >150 mL	

* Possibilité avec adaptation de l'équipement

D'après le Tableau 4, nous avons pu constater que le moulin colloïdal comme l'homogénéisateur haute pression présentent une limite pour le traitement de graines entières. Le moulin a une ouverture maximale de 3 mm entre le stator et le rotor et l'homogénéisateur a un orifice restrictif de 2 mm. Ainsi, le passage des graines entières ne serait pas possible pour la plupart de graines. Cependant, en ce qui concerne le mélangeur rotor/stator, ce verrou est levé car la possibilité de choisir différents stators (Figure 4), permet de traiter toute une gamme de tailles de particules solides.

Figure 4 : Différents stators adaptables à la tête de travail du mélangeur rotor/stator : **1.** Tête de désintégration polyvalente **2.** Tête de désintégration à fentes **3.** Grille à trous carrés à haut cisaillement

Le Tableau 5 présente ainsi un bilan des possibilités offertes par les différents outils dans la déstructuration des graines entières. Nous observons bien que seul le mélangeur rotor/stator est capable de traiter toutes les géométries des graines en modifiant le stator en fonction de la taille de la graine. Pour le moulin colloïdal, il n'y a que les graines de petite taille qui peuvent être traitées par cet outil, comme le colza et le lin. De plus, il ne peut pas travailler avec un milieu chargé en graines entières à cause des colmatages ; c'est pourquoi l'ajout de graines entières devrait être progressif au système. Pour les cas où l'outil n'est pas capable de déstructurer la graine toute entière, nous pouvons prévoir un prétraitement. Par exemple, un broyage des graines entières avec le mélangeur rotor/stator, permettant de réduire la taille des particules, le broyat pouvant ainsi suivre un traitement supplémentaire avec un autre outil. C'est le cas par exemple de l'homogénéisateur haute pression, qui, pour toutes les graines, nécessite un prétraitement.

Tableau 5 : Bilan des possibilités pour la déstructuration des graines entières : **1.** Tête de désintégration polyvalente **2.** Tête de désintégration à fentes **3.** Grille à trous carrés à haut cisaillement ✓. Possible ×. Impossible

Graine	**Equipement**		
	Mélangeur rotor/stator	**Moulin colloïdal**	**Homogénéisateur haute P**
Colza	3	✓	×
Tournesol	2 entières 3 décortiquées	×	×
Lin hiver	3	✓	×
Lin printemps	3	✓	×
Soja	1	×	×

3.2.1.2 Effet de l'équipement dans le broyage des graines par voie aqueuse

Après avoir présenté les différents équipements, nous voulons comparer l'influence de leur action dans la fragmentation des graines oléoprotéagineuses. Nous allons évaluer l'efficacité du broyage en mesurant la fraction lipidique libérée des graines et récupérée suite à une centrifugation. En fait, cette efficacité est en relation avec la diminution de la taille des particules, ce qui veut dire, une rupture plus importante des parois cellulaires, et donc un accès plus important aux corps lipidiques pour l'eau. L'avantage de mener cette étude avec la graine de colza est que nous pouvons utiliser le moulin colloïdal avec des graines entières.

P.1 Protocole

Pour tous les essais, des lots de 2 kg ont été traités avec une teneur massique de 20 % de graines fraîches de colza. Le broyage de graines a été effectué en utilisant différents outils : le mélangeur rotor/stator (avec simple ou double rotor), le moulin colloïdal et l'homogénéisateur haute pression. Les principes d'actions et les modes opératoires de ces trois appareils sont différents, ce qui empêche d'établir un même protocole ou une même durée d'action. Ainsi, nous pouvons présenter les conditions qui ont été employées pour chaque équipement. Après broyage, les corps lipidiques libérés sont récupérés du milieu dans une phase émulsionnée à l'aide de deux centrifugations successives de 10 minutes à 5 000× g et 6 °C.

Tableau 6 : Protocole opératoire dans le broyage des graines de colza avec différents outils

Appareil		Mode opératoire	Option	Condition	Durée de broyage	Graines
Mélangeur rotor/stator	**Rotor simple**	Batch	Grille à trous carrés à haut cisaillement	Puissance max (250 W)	10 min	Entières
	Double rotor					
Moulin colloïdal		Continu	En recirculation	Ecart variable (0-3 mm)	60 min	Entières
Homogénéisateur haute pression		Continu	2 passages	350 bar	30 min	Broyées

Le Tableau 6 montre les conditions qui ont été établies pour chaque outil dans cette étude. Nous remarquons que le mélangeur rotor/stator dispose à la fois d'un rotor simple et d'un double rotor. Leur effet sera observé lors de cette étude. L'ajout des graines de colza se

fait sous forme de graines entières pour le mélangeur et le moulin colloïdal. Cependant, cet ajout se fait de façon progressive de façon à éviter de possibles colmatages. Dans le cas de l'homogénéisateur haute pression, une déstructuration de la graine est nécessaire. Nous avons donc décidé de la réaliser avec le mélangeur équipé du double rotor. Il faut remarquer que les conditions opératoires de l'homogénéisateur (2 cycles à 350 bar) sont celles que Mechling a mis au point au cours de ses travaux de thèse[7].

Le Tableau 7 concentre ces résultats obtenus après le broyage des graines de colza pour chacun des équipements. La teneur en lipides libérés constituant la phase émulsionnée, comme la taille moyenne des coques de la fraction solide, sont quantifiées.

Tableau 7 : Bilan du broyage avec les différents équipements

Appareil	Rotor	Taille moyenne des fragments de coques	Fraction émulsionnée (en masse)	Lipides libérés	Taille moyenne des gouttelettes
Mélangeur rotor/stator	Simple	1050 µm	15,1 %	47,6 %	0,86 µm
	Double	850 µm	16,4 %	58,7 %	0,84 µm
Moulin colloïdal	-	676 µm	17,6 %	48,8 %	0,79 µm
Homogénéisateur haute pression	-	226 µm	19,9 %	66,6 %	0,73 µm

Nous observons, d'après ces résultats, comment les équipements traitent différemment une même graine. La taille moyenne des particules solides (coques) est différente pour chaque outil. Ce fait est associé aux forces de cisaillement qui sont transférées de l'outil à la graine. En principe, plus cette force de cisaillement est importante, plus les corps lipidiques sont libérés. Nous observons alors que c'est le mélangeur équipé du rotor simple qui offre le moins de contraintes mécaniques. Il donne la plus grande taille moyenne des particules et la moins grande quantité de corps lipidiques libérés. En contrepartie, c'est l'homogénéisateur qui déstructure le plus la graine et libère 2/3 des corps lipidiques contenus dans la graine au départ. Il est vrai que nous ne pouvons pas analyser l'effet de l'homogénéisateur seul ; néanmoins il est aussi évident que les contraintes appliquées par cet appareil ne sont atteintes par aucun autre outil.

L'utilisation du moulin colloïdal ne semble pas intéressante. Même si la taille des gouttelettes est inférieure à celle obtenue avec le mélangeur rotor/stator, la durée du procédé est 6 fois plus importante, ce qui veut dire une consommation plus importante d'énergie. De plus, la fraction des lipides libérés n'est pas supérieure à celle du mélangeur équipé du double rotor. Ce phénomène est étonnant car en toute logique l'obtention de particules plus fines devrait entraîner une meilleure libération des lipides.

Il faut remarquer que dans tous les essais réalisés lors de cette étude, nous avons fait des observations microscopiques de toutes les phases émulsionnées obtenues. Ceci nous a permis de constater que dans tous les cas nous sommes bien en présence de milieux dispersés où la taille des gouttelettes comprise entre 0,73 µm et 0,86 µm est proche de celle des oléosomes. Ces technologies de broyage nous ont bien permis de libérer ces structures de la graine entière pour constituer une phase émulsionnée compacte après centrifugation, qui oscille entre 15 et 20 % de la masse totale du milieu.

D'après ces résultats, il semble que le meilleur choix est d'utiliser un broyage avec le mélangeur rotor/stator suivi par un traitement du milieu dans l'homogénéisateur haute pression. Cette combinaison permet d'utiliser l'homogénéisateur pour toutes les graines.

3.2.1.3 Influence du rapport graine / eau dans l'efficacité du broyage

Un paramètre important lors du broyage est le rapport qui existe entre la quantité des graines et l'eau. D'un point de vue environnemental, il est convenable que ce rapport soit élevé, ce qui diminue la consommation d'eau. Cependant, d'un point de vue opérationnel, une teneur importante en eau facilite l'action mécanique des outils sur les graines en diminuant la viscosité du milieu et en facilitant la récupération des corps lipidiques. Pour cela il faut faire un compromis et choisir un bon rapport.

Le Tableau 8 illustre les pourcentages massiques que d'autres auteurs ont employés lors du broyage aqueux de différentes graines, et avec divers équipements, pour la libération des lipides. Nous pouvons observer que dans tous les cas la proportion de graines dans le milieu oscille entre 13,5 et 20 %.

Tableau 8 : Exemples de teneurs en graines fraîches lors du broyage en présence d'eau

Pourcentage massique en graines	Graine	Equipement	Référence
13,5	Colza	Mixeur	Mechling, 2002[7]
15	Tournesol	Mixeur	Evon, 2008[8]
15	Tournesol	Mélangeur rotor/stator	
20	Tournesol	Extrudeur bi-vis	Evon *et coll.*, 2007[9]

Nous remarquons comment les pourcentages des graines fraîches varient en fonction de la performance des outils. Si bien, un simple mixeur de type bol à couteaux a permis de travailler avec une teneur de 13,5 %, l'extrudeur bi-vis, qui présume de ne pas avoir une consommation importante d'eau, a permis d'introduire jusqu'à 20 % de graines. C'est pourquoi nous avons voulu tester la technologie que nous proposons avec une teneur supérieure en graines fraîches de 20, 25 et 30 %.

P.2 Protocole

Des lots de 2 kg ont été traités avec de teneurs massiques de 20, 25 et 30 % de graines fraîches de colza. Le broyage de chaque lot a été réalisé avec le mélangeur rotor/stator équipé du double rotor à puissance maximale pendant 10 minutes. A la fin le milieu est centrifugé successivement deux fois pendant 10 minutes à 5 000× g et 6 °C.

Après séparation de phases, nous déterminons la fraction de lipides libérés dans la fraction émulsionnée. L'effet du rapport graine/eau sur la quantité de lipides libérés est montré dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Rendements en lipides extraits en utilisant différents pourcentages de graines de colza

Pourcentage massique en graines	Température à la fin du broyage	Pourcentage massique en lipides libérés
20	31,6 °C	58,7
25	34,0 °C	51,8
30	36,2 °C	43,7

Plus la teneur en graines augmente dans le milieu, plus le pourcentage de lipides extraits diminue. De plus, la température du milieu à la fin du broyage augmente avec la teneur en solides, ceci est dû à la résistance offerte par le milieu aux contraintes mécaniques

exercées par l'outil, sans pour autant améliorer le rendement d'extraction. D'après ces résultats, nous avons décidé de travailler, avec les outils que nous proposons, à partir de milieux constitués de 20 % de graines.

3.2.1.4 Evolution du milieu lors du broyage

Au cours du broyage, il est important d'avoir des paramètres indicateurs qui nous permettent de suivre l'évolution de la « qualité du broyage ». Nous avons choisi comme indicateurs : la taille des particules solides qui traduit le degré de déstructuration présenté par la graine, la proportion de la phase émulsionnée qui traduit le rendement de la libération des lipides, la taille des gouttelettes et la viscosité du milieu au cours du broyage.

P.3 Protocole

Un milieu de 2 kg, avec une teneur massique de 20 % de graines fraîches de colza, a été traité. Ce milieu subit un broyage avec le mélangeur rotor/stator équipé du double rotor à puissance maximale pendant 10 minutes. Ensuite, le milieu broyé passe deux fois consécutives par l'homogénéisateur haute pression à 350 bars. Enfin le milieu est centrifugé deux fois pendant 10 minutes à 5 000× g et 6 °C.

C'est au cours du broyage, que des prélèvements sont effectués afin d'analyser la séparation de phases, la taille des particules solides de la fraction solide, la taille des gouttelettes de l'émulsion obtenue, comme la rhéologie du milieu.

- **Taille des particules solides :**

La Figure 5 présente l'évolution de la distribution de la taille des particules solides au cours du broyage dans le procédé (étape d'homogénéisation inclue). Cette taille a été déterminée à l'aide de la loupe binoculaire. Elle est exprimée en fréquence (pourcentage) d'apparition d'une taille précise dans la population de particules analysée.

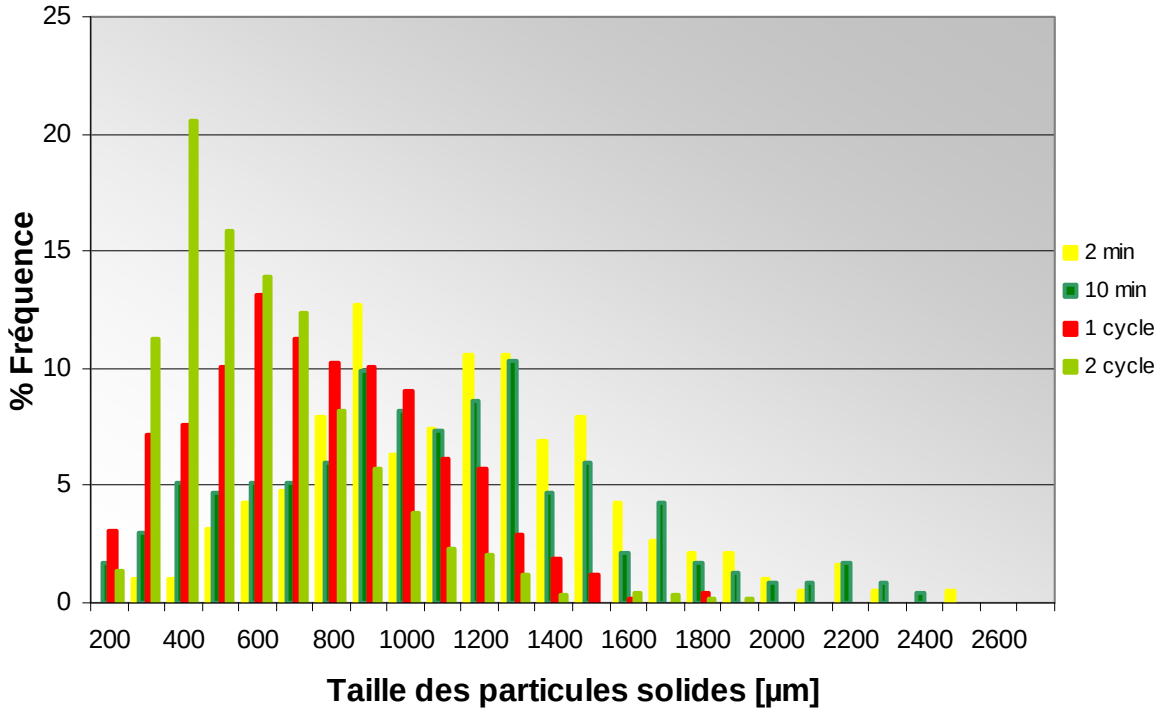


Figure 5 : Evolution de la distribution de la taille des particules solides au cours du broyage des graines de colza

Nous observons que les distributions ne changent pas significativement dans les 10 minutes du broyage avec le mélangeur rotor/stator. Cependant, la fréquence des petites tailles augmente au cours du temps, ce qui se traduit par un progrès de la déstructuration de la graine. Ce graphique montre également l'effet important qu'offrent les deux passages successifs par l'homogénéisateur haute pression à 350 bar, avec des distributions moins polydisperses et avec une fréquence plus importante des petites tailles, ce qui confirme une fragmentation plus importante de la graine.

- **Phase émulsionnée :**

Pour l'autre indicateur, celui qui concerne la séparation des phases et ainsi la proportion des lipides libérés, la Figure 6 montre l'évolution des pourcentages des trois phases formées après une centrifugation des prélèvements effectués à différents instants lors du broyage.

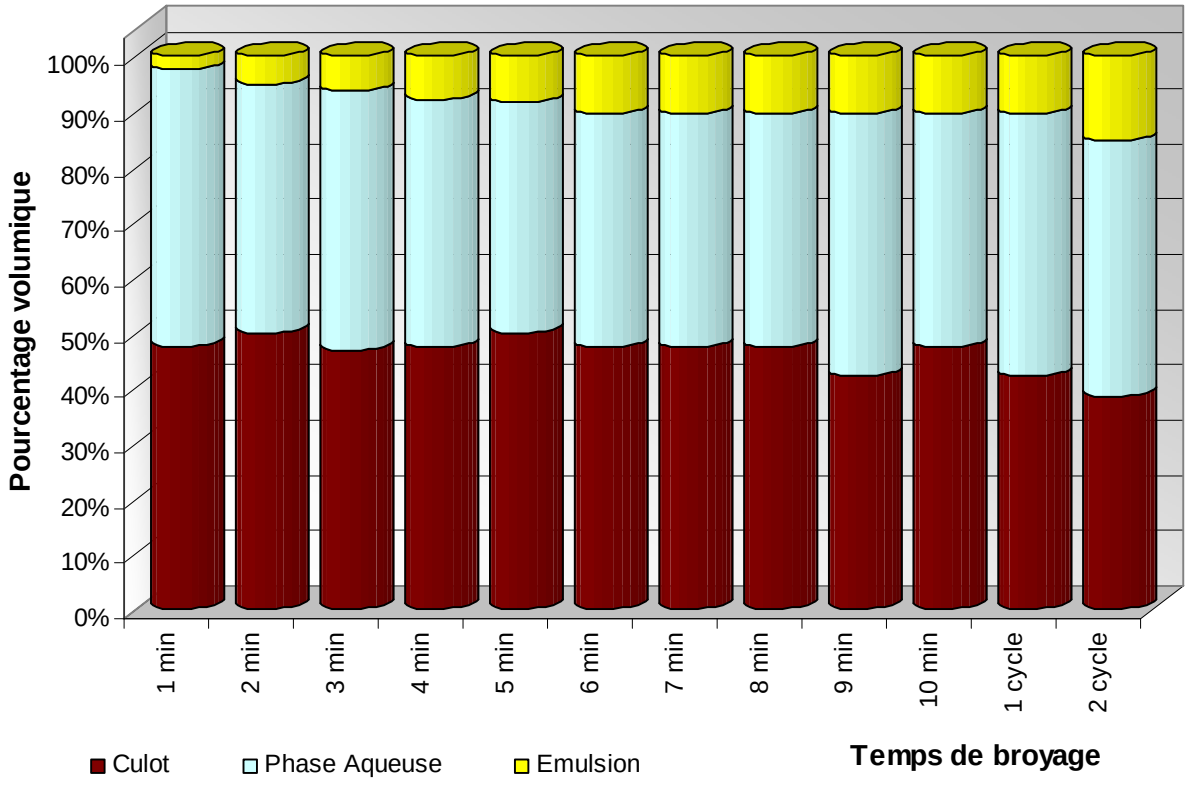


Figure 6 : Répartition des phases après séparation à différents temps du broyage des graines de colza

Nous remarquons que la fraction émulsionnée (phase supérieure après centrifugation) augmente notamment au cours des premières minutes pour arriver à une quantité plus ou moins constante dans les dernières minutes du broyage réalisé par le mélangeur rotor/stator. Les passages dans l'homogénéisateur haute pression à 350 bars augmentent considérablement la fraction émulsionnée grâce aux mêmes contraintes qui ont provoqué la déstructuration des parois cellulaires de la graine qui emprisonnent les corps lipidiques.

- **Taille des gouttelettes :**

La fraction lipidique libérée de la graine est récupérée après centrifugation sous forme d'une émulsion. Celle-ci est constituée de gouttelettes des lipides dispersées dans un milieu aqueux. La taille des gouttelettes de cette émulsion est ensuite analysée par microscopie optique et exprimée en fréquence (pourcentage) d'apparition d'une taille précise dans la population de particules analysée. La Figure 7 illustre l'évolution de la distribution de la taille de ces gouttelettes des lipides libérés lors du broyage des graines de colza. Nous observons que la distribution de tailles des gouttelettes ne varie pas significativement au cours du broyage. Nous trouvons ainsi deux populations avec une fréquence plus importante, une

première population entre 0.7 et 0.9 µm et la deuxième autour de 3 µm. La population la plus importante en fréquence correspond à celle formée par des gouttelettes de lipides qui ont la même taille que les oléosomes.

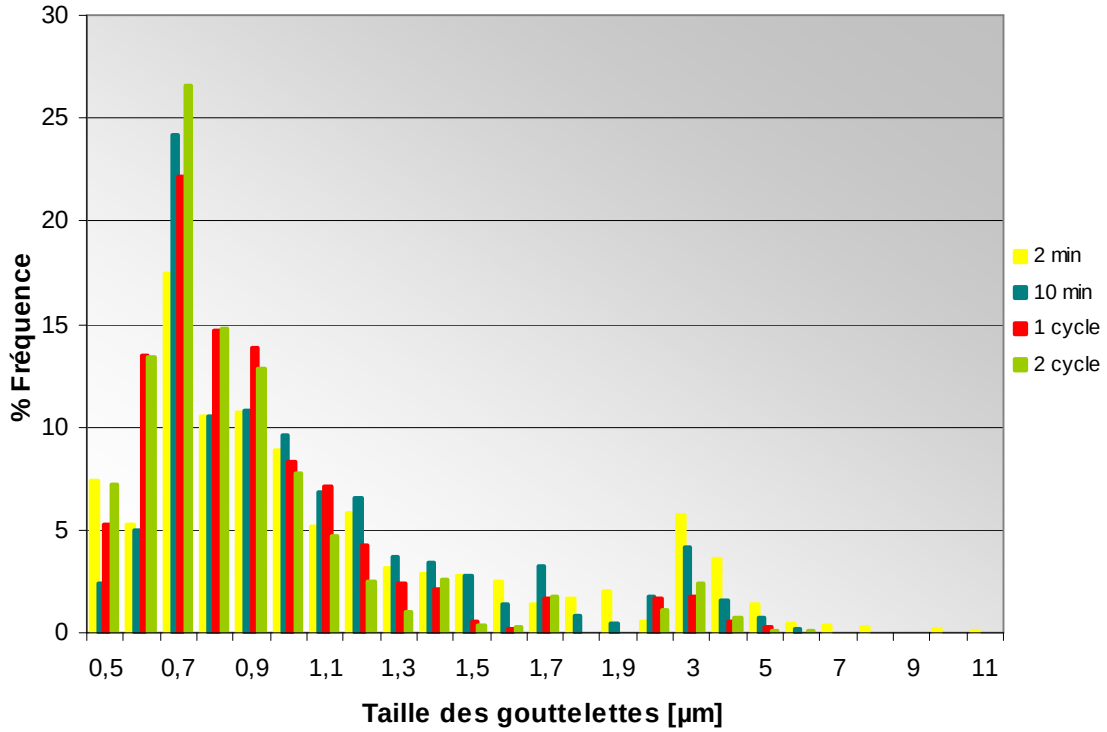


Figure 7 : Evolution de la distribution de la taille des gouttelettes au cours du broyage des graines de colza

Les légères variations qui existent correspondent à une augmentation dans la monodispersité de la population de gouttelettes de petite taille, ceci peut s'expliquer par une diminution d'autres constituants de la graine qui les entourent en augmentant la finesse et l'homogénéité des gouttelettes sans pour autant changer la masse lipidique à l'intérieur des gouttelettes. La deuxième population est moins représentée et elle ne correspond pas à la taille que les oléosomes ont naturellement dans la graine. Ceci peut s'expliquer par une coalescence des corps lipidiques ou aplatissement de ceux-ci lors de l'observation microscopique.

- **Rhéologie du milieu :**

Un paramètre qui change au cours du broyage des graines, c'est la rhéologie du milieu. En effet, à mesure que la graine est déstructurée, les constituants de celle-ci seront mieux répartis et incorporés dans le milieu, ce qui provoque des changements dans la viscosité du milieu. Ainsi, des mesures de viscosité dynamique ont été réalisées à différentes contraintes de cisaillement pour chaque prélèvement effectué lors du broyage. La Figure 8

illustre comment, tout au long du broyage, la viscosité du milieu diminue en augmentant la contrainte de cisaillement.

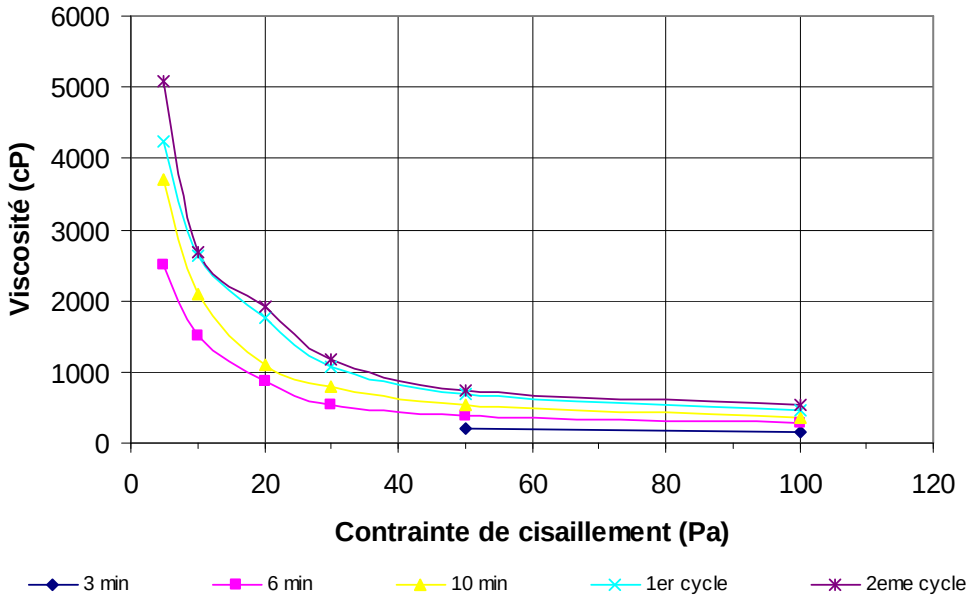


Figure 8 : Profils de la viscosité apparente du milieu à différents temps de broyage en fonction de la contrainte de cisaillement appliquée à 25 ºC

Le graphique de la Figure 9 illustre comment la viscosité apparente du milieu augmente en fonction du temps de broyage à une contrainte de cisaillement fixée (100 Pa).

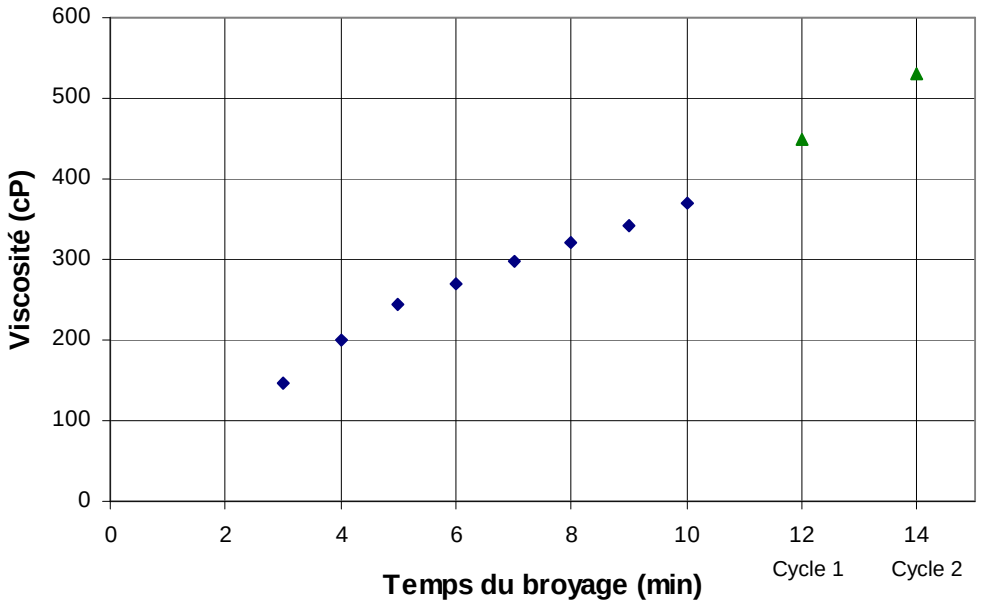


Figure 9 : Evolution de la viscosité apparente du milieu en fonction du temps de broyage à une contrainte de 100 Pa : ◆ Mélangeur rotor/stator ▲ Homogénéisateur haute pression (1er et 2ème cycle)

Ce phénomène peut s'expliquer par la libération de corps lipidiques et constituants hydrosolubles qui contribuent à une meilleure dispersion du milieu. De plus, cette augmentation dans la viscosité du milieu au cours du broyage, sert comme un frein naturel à la décantation des particules solides. En étant une dispersion solide / liquide, le milieu sera plus stable si nous augmentons la viscosité de la phase aqueuse et diminuons la taille des particules.

Le fait que la viscosité du milieu soit fonction de la contrainte de cisaillement, s'explique par le comportement rhéofluidifiant ou pseudoplastique du milieu. Cette catégorie de fluide, sous l'effet de la vitesse de cisaillement, a tendance à aligner ses molécules, ce qui favorise le glissement relatif entre les différentes couches. C'est une viscosité apparente. En faisant un traitement mathématique des données, nous pouvons obtenir les constantes rhéologiques du milieu. Nous avons d'abord choisi d'appliquer une modélisation simple au comportement rhéologique du milieu : celle d'Ostwald, aussi connue comme loi de la puissance[10] :

$$\tau = K\dot{\varepsilon}^n$$

où :

τ est la contrainte de cisaillement (Pa)

ε la vitesse de cisaillement (1/s)

K et *n* sont les deux constantes rhéologiques qui caractérisent le fluide. Elles sont connues comme le coefficient de consistance (*K*) et l'indice de comportement (*n*).

Après une modélisation des différentes courbes du graphique de la Figure 8, en faisant des régressions linéaires (avec des coefficients de corrélation toujours supérieures à 0,99) d'un graphique logarithmique de τ vs. ε, nous obtenons les constantes *K* et *n*. Pour tous les prélèvements analysés, la valeur de *n* est restée presque constante avec une valeur de 0,56. Ce qui confirme le comportement pseudoplastique du milieu. Dans le cas de la valeur de *K*, elle a augmenté en même temps que le temps de broyage : 3,4 après 6 minutes de broyage jusqu'à 5,0 après le deuxième passage dans l'homogénéisateur haute pression. Ce qui corrobore l'augmentation de la viscosité apparente (η en Pa·s) en fonction du temps de broyage d'après

l'expression suivante :

$$\eta = K\dot{\varepsilon}^{n-1}$$

En vue d'une industrialisation du procédé, un suivi de la qualité du broyage par mesures de la viscosité dynamique ou apparente du milieu est fondamental. De plus, une caractérisation rhéologique du milieu peut fournir des informations importantes lors de la sélection d'équipements par rapport aux opérations d'agitation et de pompage à l'échelle industrielle.

3.2.2 Mécanisme de libération des lipides à partir de la graine

Tout au long de ces travaux de thèse, une question s'est posée : Comment les lipides sont libérés dans l'eau pour former une émulsion ? Est-ce que les corps lipidiques sont extrait tels qu'ils se trouvent dans la graine ? Ou sont-ils détruits et ensuite reconstruits ?

Certains auteurs ont essayé de comprendre les facteurs ou les mécanismes qui entrent en jeu dans l'extraction aqueuse simultanée de lipides et de protéines, comme Rosenthal *et coll.* sur la graine de soja.[11]. Ils ont observé que des variables comme le pH ou la température entrent en jeu dans l'extraction de lipides, alors que la proportion solide/liquide affectait uniquement l'extraction de protéines. Ils ont conclu que ces extractions impliquent l'endommagement des parois cellulaires, et que dans le cas des protéines, celle-ci répond à un mécanisme de solubilisation et diffusion. Cependant aucune explication n'est donnée quant à la libération, organisée ou pas, des lipides.

Evon a, au sein de notre laboratoire, essayé de répondre à cette question au cours de ses travaux de thèse[8]. Il affirme que l'extraction d'huile et des protéines se fait de façon séparée, et que la stabilisation de l'huile sous forme émulsionnée se fait à l'extérieur de la graine grâce aux protéines. D'autre part, Campbell et Glatz[12], ont montré que l'émulsification était justement un mécanisme important pour favoriser l'extraction aqueuse de l'huile de soja, c'est-à-dire, que pour quitter la matrice végétale, les lipides doivent être sous forme d'une émulsion.

C'est cette dernière hypothèse que nous soutenons. De plus, dans les travaux concernant la caractérisation des oléosomes, la purification de ces structures est réalisée grâce à un broyage aqueux[13]. Nous pensons que ce sont les lipides, sous forme d'oléosomes, qui sont libérés et entraînés dans l'eau présente lors du broyage, grâce au pouvoir amphiphile des molécules qui entourent cette structure déjà présentée. Ainsi, l'eau, qui a une forte affinité pour la matière végétale, rentre en contact avec les oléosomes lorsque les parois cellulaires qui les emprisonnent sont abîmées par l'outil de broyage. Ces gouttelettes lipidiques, protégées par des phospholipides et des oléosines, présentent une bonne affinité pour l'eau grâce aux groupes polaires de ces deux tensioactifs natifs. Ensuite, ces structures seront transportées de la matrice vers le milieu. Ce transport peut se faire de façon naturelle, néanmoins il est favorisé par les contraintes mécaniques produites lors du broyage. En effet, cette diffusion naturelle n'est pas rapide. Dans la littérature nous trouvons des valeurs de coefficients de diffusion des constituants de matière végétale de l'ordre de 10^{-12} ou 10^{-14} m^2/s [8, 14].

De façon à soutenir l'hypothèse que la libération des lipides se fait sous forme d'émulsion, nous avons voulu démontrer que ce transport se fait naturellement, sans présence de forces de cisaillement qui donneraient naissance aux gouttelettes.

P.4 Protocole

Des graines de colza sont déstructurées légèrement, à sec, à l'aide d'un broyeur de type moulin à café. Ensuite, le broyat est mis au contact de l'eau avec le même rapport graines/eau utilisé dans le procédé intégré (20/80 w/w). Le tout subit une légère agitation à l'aide d'un barreau aimanté pendant 10 minutes, de façon à assurer le contact entre solide et liquide. À la fin de ce temps, des observations microscopiques sont effectuées sur le surnageant.

La déstructuration à sec des graines sert à réduire la taille des particules et à déstructurer les parois cellulaires de la graine. La Figure 10 est une image prise lors des observations microscopiques.

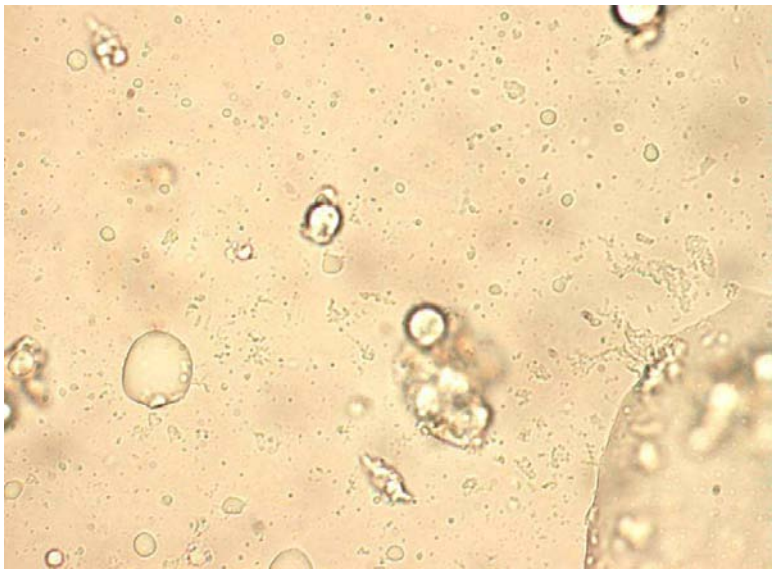


Figure 10 : Observation microscopique x 1 000 (objectif à immersion dans l'huile) du surnageant

Nous observons la présence des débris cellulaires qui ont une taille importante. En même temps, nous observons la présence de gouttelettes dispersées dans tout le champ d'observation. La taille moyenne de ces gouttelettes se positionne autour de 0.8 µm, ce qui correspond à la taille des oléosomes de la graine de colza rapportée dans la littérature[15]. Nous pouvons ainsi confirmer que le transport de corps lipidiques à l'extérieur de la matrice végétale se fait sous forme organisée. Ainsi, les contraintes mécaniques, sans détruire la structure des oléosomes, permettent d'augmenter leur libération.

3.2.3 Séparation des phases après broyage

La fragmentation des graines en présence d'eau engendre un milieu hétérogène. Les milieux hétérogènes sont ceux formés par plusieurs phases. Dans notre cas, il s'agit d'un milieu constitué de deux phases liquides non miscibles et d'une phase solide. Ce milieu est constitué par les corps lipidiques et les débris cellulaires de la graine dispersés dans une phase aqueuse enrichie en substances hydrosolubles provenant de la même graine. Après broyage, si nous voulons récupérer ces constituants dans différentes fractions, il faudra réaliser une séparation.

L'avantage des milieux hétérogènes par rapport aux milieux homogènes lors d'une séparation, c'est qu'elle peut être réalisée avec des opérations unitaires « simples » qui, en l'occurrence, ne demandent pas beaucoup d'énergie. Ces opérations sont la centrifugation, la

décantation, ou la filtration. Les deux premières sont basées sur une différence de densité des phases, grâce à une force d'accélération (soit terrestre ou centrifuge). La troisième est basée sur la rétention de particules solides à l'aide d'un solide poreux.

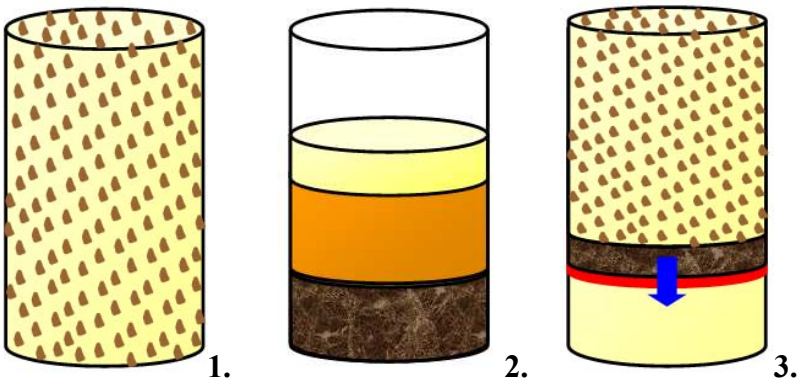


Figure 11 : Schéma du type de séparation obtenu sur le milieu issu du broyage des graines en présence d'eau par centrifugation ou filtration : **1.** Milieu après broyage **2.** Milieu après centrifugation **3.** Milieu après filtration

Ces techniques, avec des principes d'action différents, auront des effets aussi différents sur notre milieu hétérogène. La Figure 11 illustre quel type de séparation nous obtenons par centrifugation ou par une filtration en partant d'un broyat des graines. Nous remarquons que l'action d'une force centrifuge permet la séparation des particules solides, voire la concentration de la phase dispersée. Une filtration du broyat des graines permettra uniquement la séparation des particules solides du reste liquide.

Les travaux de recherche impliquant une récupération des corps lipidiques font appel à la filtration du broyat pour récupérer la fraction solide suivie par des centrifugations qui permettent d'obtenir une fraction émulsionnée enrichie en oléosomes[16, 17]. Cependant ce sont des opérations qui se font pour de petites quantités et qui présentent des inconvénients au moment de l'application pour des volumes beaucoup plus importants. Notamment pour la filtration, qui présente vite un colmatage pour des milieux riches en solides. C'est ainsi que nous réalisons plutôt la centrifugation du broyat, comme cela a été déjà réalisée dans les travaux de Mechling[7]. De plus, cette approche n'implique pas d'autres produits tels que ceux qui ont été ajoutés lors des travaux cités précédemment, ce qui est en accord avec les principes de la chimie verte.

P.5 Protocole

Après le broyage, la séparation de phases du milieu s'est faite à 5 000× g pendant 10 min et 6 °C, à l'aide d'une centrifugeuse équipée d'un rotor d'angle variable qui a une capacité de 4×400 mL, ce qui permet d'obtenir une séparation avec des interphases à l'horizontale. Après centrifugation, les différentes phases sont récupérées en versant délicatement l'émulsion et la phase aqueuse sur un filtre en nylon avec des mailles de 100 µm, de façon à retenir l'émulsion et la séparer de la phase aqueuse qui traverse la toile.

La Figure 12 illustre la séparation obtenue pour un broyat contenant 20 % de graines de colza. Nous observons bien trois phases différentes : une phase émulsionnée en surface contenant les corps lipidiques libérés, une phase aqueuse au milieu et une phase solide. Cette dernière est constituée par deux couches : celle du fond constitués majoritairement par les coques, d'après sa couleur foncée et celle qui touche la phase aqueuse, d'aspect plus clair constituée des composés non solubles de la graines, hors des coques.

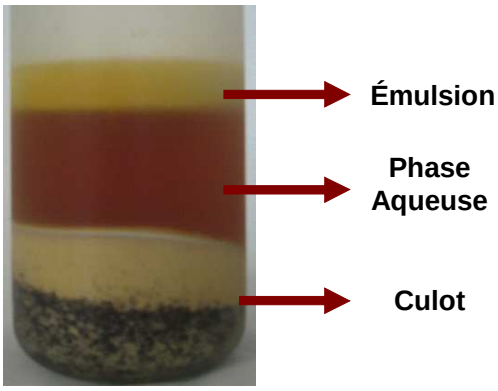


Figure 12 : Répartition des phases après fractionnement par centrifugation d'un broyat contenant 20 % de graines de colza

Après une première centrifugation, nous réalisons d'autres centrifugations de façon à récupérer plus de lipides sous forme d'émulsion à partir de la phase solide, à nouveau suspendue dans la même phase aqueuse.

Le Tableau 10 montre l'augmentation de la fraction émulsionnée totale récupérée en fonction du nombre de centrifugations. Nous observons que cette augmentation devient moins importante après deux centrifugations. De plus, si le nombre de centrifugation est important, le temps et l'énergie deviendront importants. Pour cette raison, nous avons finalement choisi le procédé à deux centrifugations.

Tableau 10 : Proportion de fraction émulsionnée totale récupérée en fonction du nombre de centrifugations réalisées pour le broyat contenant 20 % de graines de colza

Nombre de centrifugations	Fraction émulsionnée totale
1	14,1 %
2	19,6 %
3	23,0 %
4	23,9 %

Finalement, la Figure 13 illustre les étapes et les conditions expérimentales choisies lors de la mise en œuvre du procédé intégré pour la libération des lipides des graines de colza sous forme d'émulsion native.

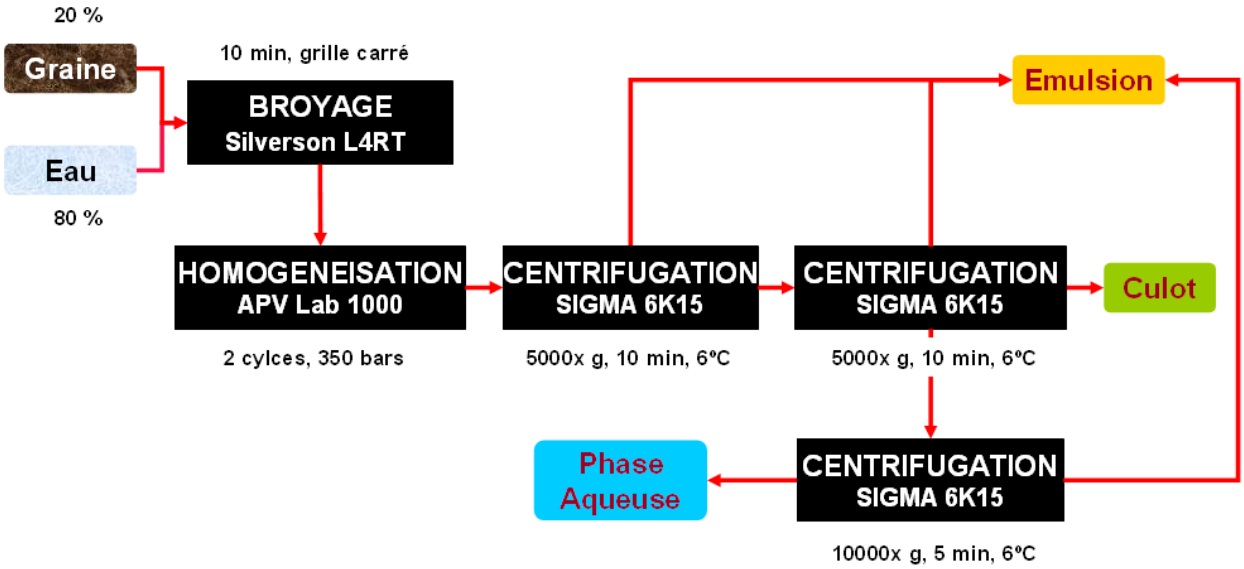


Figure 13 : Schéma du protocole opératoire du procédé intégré pour le traitement des graines de colza

3.3 Analyses des différentes phases obtenues après libération des lipides endogènes par le procédé intégré

Après avoir présenté les travaux du développement du procédé intégré, il est temps de présenter les résultats des analyses effectuées sur les différentes fractions obtenues lors de la libération par voie aqueuse des lipides endogènes des graines de colza par procédé intégré.

Le Tableau 11 illustre les compositions chimiques des différentes fractions libérées. D'autres caractéristiques des phases, comme le pH, la taille des gouttelettes, la taille des particules solides, la conductivité s'avèrent intéressantes en vue de la connaissance et de l'exploitation de ces fractions pour différents usages.

Tableau 11 : Bilan des résultats d'analyse des différentes fractions de colza obtenues après le procédé intégré

Fractions	Emulsion	Phase Aqueuse	Culot
Proportion Massique (%)	23,4	46,4	30,2
pH	5,5	5,5	-
Conductivité (µS/cm)	1 750	3 520	-
Taille des gouttelettes (µm)	0,8	-	-
Taille des particules solides (µm)	-	-	430
% Eau	65,3	96,41	72,0
% Lipides	26,3	N.D.	10,7
% Protéines	5,1	1,5	4,0
% Phosphore*	0,29	0,05	0,21
% Constituants pariétaux	-	-	4,8
% Minéraux	0,6	0,1	0,9
Acides gras libres (% par rapport aux lipides)	0,4	N.D.	N.D.
Teneur en stérols (mg/100g de phase)	193,6	N.D.	91,6
Teneur en tocophérols (mg/100g d'huile)	67,3	N.D.	56,4

* Pourcentage en phosphore total
N.D. Non Déterminé

Les trois fractions obtenues ont des teneurs en constituants très différentes les unes des autres. La fraction émulsionnée, constituée principalement d'eau et de lipides, est stabilisée par des tensioactifs natifs : des protéines et des phospholipides. C'est grâce aux observations microscopiques et aux mesures de conductivité que nous déterminons le type de l'émulsion. L'émulsion est directe, constituée de gouttelettes d'une taille moyenne de 0,8 µm (Figure 14). En effet, la valeur de la conductivité de l'émulsion est du même ordre de grandeur que celle de la phase aqueuse qui est ici la phase continue. Il en résulte la formulation de lipides endogènes sous forme d'émulsion diluée dans l'eau stabilisée par les tensioactifs natifs en l'absence d'ingrédients exogènes (solvants, agents interfaciaux, modificateurs de viscosité, etc…).

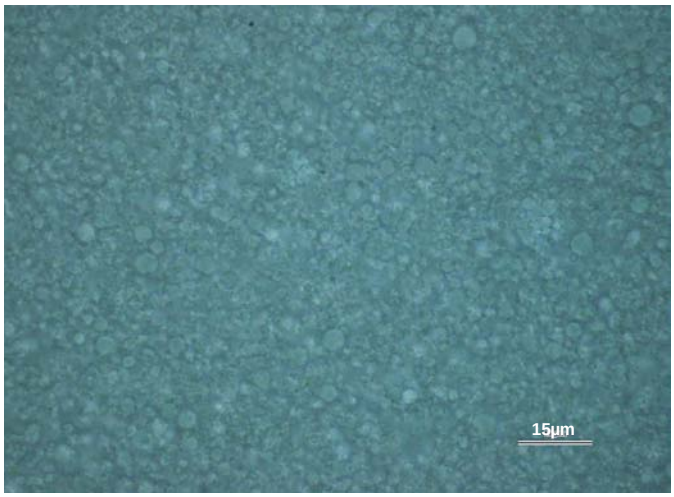


Figure 14 : Observation microscopique x 1 000 (objectif à immersion dans l'huile) de l'émulsion concentrée du procédé intégré réalisé avec du colza. L'échelle représente 15 µm

Si nous observons maintenant la phase aqueuse médiane, nous constatons que c'est la phase majoritaire. Elle contient les constituants hydrosolubles de la graine : des protéines hydrosolubles, des minéraux, des sucres et même des vitamines hydrosolubles qui font de cette phase un bon candidat pour l'irrigation dans l'agriculture. Cette phase représente ainsi une formulation directement utilisable.

En examinant la fraction solide obtenue (culot), nous constatons que c'est un produit qui retient beaucoup d'humidité, grâce aux constituants pariétaux (cellulose, hémicellulose et lignine) et protéines qui le constituent. Nous remarquons une présence non négligeable de lipides. En l'état, sa valorisation dans l'alimentation animale est aisée. De plus, cette fraction présente un avantage par rapport aux tourteaux obtenus généralement lors des procédés d'extraction classiques des lipides et des matières grasses. Elle est exempte de solvants organiques. La cogénération de biocombustible/bioénergie de seconde génération est une autre possible utilisation de ce produit. C'est une source de nutriments et de carbone en tant que biomasse protéique et lignocellulosique disponible en milieu aqueux conducteur.

3.3.1.1 Répartition des constituants mineurs

Au cours de cette étude, nous avons examiné la séparabilité des constituants mineurs et leur répartition entre les deux phases contenant les lipides : l'émulsion et le culot. Nous incluons dans cette catégorie les stérols et tocophérols, déterminés par des méthodes chromatographiques.

Tableau 12 : Profil de stérol dans la graine entière de colza, ainsi que dans l'émulsion et le culot obtenus lors du procédé intégré (en pourcentage massique)

Phase	Graine entière	Emulsion	Culot
Brassicastérol	15,6 %	15,3 %	14,7 %
Campestérol	33,0 %	30,0 %	27,8 %
Stigmastérol	0,5 %	2,5 %	3,9 %
β Sitostérol	48,6 %	47,8 %	49,0 %
Δ5 Avénastérol	2,3 %	1,7 %	1,9 %

Le Tableau 12 illustre la teneur en stérols dans chacune des phases. Nous remarquons que les profils de stérols ne changent pas beaucoup entre la graine entière et les phases obtenues.

La teneur des tocophérols, ainsi que la répartition entre les molécules α et γ (espèces majoritaires dans l'huile de colza) dans l'émulsion et le culot obtenus avec le procédé intégré sont indiquées dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Composition en tocophérols dans l'émulsion et le culot obtenus lors du procédé intégré avec la graine de colza

Phase	Emulsion	Culot
Tocophérols (mg/100g d'huile)	67,3 ± 6,7	56,4 ± 2,1
% α tocophérols	35,8 ± 0,1	27,7 ± 0,6
% γ tocophérols	64,2 ± 0,1	72,4 ± 0,6

Nous constatons, d'après ces résultats, que la teneur en tocophérols ne présente pas de différence significative entre l'émulsion et le culot. Les tocophérols α et γ sont présents en proportions similaires dans ces deux phases. Notons toutefois que le γ tocophérol possède la concentration la plus importante. Ceci est intéressant, car le pouvoir antioxydant de ces deux molécules a été constaté pour des émulsions huile dans l'eau[18].

3.3.1 Stabilité de l'émulsion issue du procédé intégré

Étant donné que la phase émulsionnée est la fraction d'intérêt majeur, nous allons nous intéresser à l'étude de sa stabilité physique.

3.3.1.1 Stabilité physique de l'émulsion

Comme nous l'avons expliqué dans le Chapitre 1, la stabilité physique d'une émulsion dépend de plusieurs paramètres. Une émulsion n'est pas thermodynamiquement stable. Nous avons testé la résistance de celle-ci à la démixtion. Ainsi nous pourrons proposer les conditions qui peuvent favoriser sa séparation.

Nous avons mentionné à plusieurs reprises que ce sont les protéines, associées à des phospholipides, qui stabilisent cette émulsion. En effet, l'analyse de la composition chimique de l'émulsion a révélé la présence de protéines en proportion élevée. Donc l'appauvrissement de l'émulsion en protéines pourrait favoriser le « cassage » de l'émulsion. C'est pourquoi, nous avons réalisé des lavages de protéines en employant plusieurs protocoles pour appauvrir l'émulsion en protéines. Les différents pourcentages résiduels de protéines dans l'émulsion après lavage sont notés dans la Figure 15.

Nous constatons que le fait d'utiliser des solutions de lavage basiques, par rapport au pH initial de l'émulsion égal à 5,5, diminue la quantité des protéines présentes dans l'émulsion. C'est la conséquence de la modification de l'état d'ionisation des protéines qui sont alors davantage solubles. La solubilisation des protéines et par conséquent l'appauvrissement des protéines dans l'émulsion concentrée, après centrifugation, sont favorisés. Ainsi les meilleurs résultats après les trois lavages sont obtenus avec le Tris-HCl à 0,1 M. Cependant, nous observons que la diminution de la teneur en protéines entre les lavages ne suit pas la même tendance pour chaque solution testée. D'autre part, nous n'observons pas d'effet important de la température lors des lavages réalisés à 50 °C par rapport aux lavages réalisés à température ambiante.

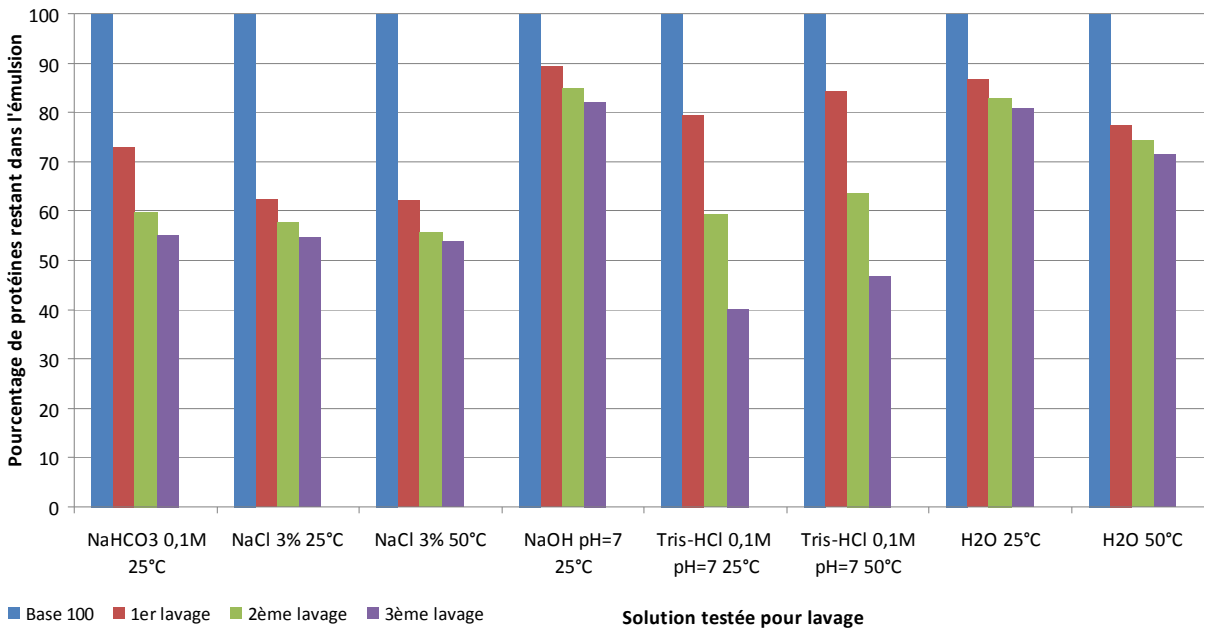


Figure 15 : Evolution de la teneur protéique dans l'émulsion après lavages

Nous avons ensuite testé la stabilité de ces émulsions appauvries en protéines en utilisant la méthode du cycle gel-fusion[19] suivie d'ajustement du pH à 4, pour augmenter la floculation des gouttelettes. L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau 14. Nous remarquons d'abord la stabilité non négligeable du témoin soit l'émulsion concentrée. En effet seulement 7.5 % des lipides sont séparés après un choc thermique assez important, traduit par la variation de température de -196 °C à 103 °C.

Nous observons que dans tous les cas, l'extraction de lipides est plus importante pour les émulsions lavées après un cycle gel-fusion et ajustement du pH à 4. Cependant, la démixtion reste modérée. Comme nous l'avons constaté dans le Chapitre 2, il y a une explication à cet effet : même si nous enlevons une grande quantité des protéines, celles qui resteront dans l'émulsion seront majoritairement des oléosines, ce qui empêchera la coalescence des toutes les gouttelettes et ainsi la démixtion totale.

Nous pouvons conclure d'après ces résultats, que la présence des protéines non membranaires (avec l'ensemble de constituants non membranaires) est indispensable pour une bonne stabilité face à la coalescence, bien qu'elles favorisent le crémage de l'émulsion. D'où l'intérêt de conserver ces constituants pour la suite des travaux tout en essayant d'inhiber la floculation des gouttelettes.

Tableau 14 : Pourcentages de lipides récupérés après le cycle gel-fusion appliqué sur l'émulsion

Solution testée	Nombre de lavages	% de lipides récupérés après cycle gel-fusion et ajustement du pH = 4
Témoin	0	7,52
Eau distillée	1	36,91
	2	38,37
	3	49,09
NaCl 3 %	1	20,75
	2	25,30
	3	31,86
$NaHCO_3$ 0,1 M	1	42,21
	2	28,12
	3	32,69
Eau + NaOH pH = 7	1	37,29
	2	39,20
	3	33,13
Tris HCl 0,1 M pH = 7	1	18,99
	2	23,66
	3	30,39

3.4 Séchage de l'émulsion issue du Procédé Intégré

L'émulsion directe (huile dans l'eau), génère deux problèmes : une dégradation due à un développement microbien, mais aussi un coût élevé de transport et de stockage. Une réduction de la quantité d'eau présente dans cette émulsion pourrait résoudre ces soucis. Le passage de l'émulsion aqueuse à l'émulsion sèche redispersable est l'objectif du travail poursuivi dans la suite des travaux.

Dans le cas d'émulsions directes, où la phase continue est plus volatile que la phase dispersé, les technologies de séchage d'encapsulation semblent être le meilleur choix, parce qu'il s'agit de procédés qui permettent de conserver l'organisation des gouttelettes lors de la disparition du milieu dispersant. Parmi ces techniques, la lyophilisation et l'atomisation, sont largement utilisées dans l'industrie. Ce séchage met en jeu des phénomènes physiques et/ou mécaniques : soit par une congélation suivie d'une sublimation ou par une évaporation lors

d'une pulvérisation[20]. Après séchage, la phase dispersée se retrouvera sous forme solide, on obtient alors une poudre sèche qui peut être redispersée[21].

3.4.1 Technologies de séchage

3.4.1.1 Lyophilisation

La lyophilisation est une opération qui consiste à déshydrater un produit par sublimation sous vide de l'eau présente dans celui-ci. Ce procédé est constitué de deux opérations successives : une congélation suivie par une déshydratation. Cette dernière se fait grâce à la sublimation de la glace formée lors de la congélation. Plusieurs technologies peuvent être mises en œuvre pour réaliser une lyophilisation. La sublimation peut être conduite soit par abaissement de la pression totale ou soit par abaissement de la pression de vapeur d'eau au voisinage direct du produit et en présence d'adsorbants. Nous allons nous intéresser à la lyophilisation sous vide.

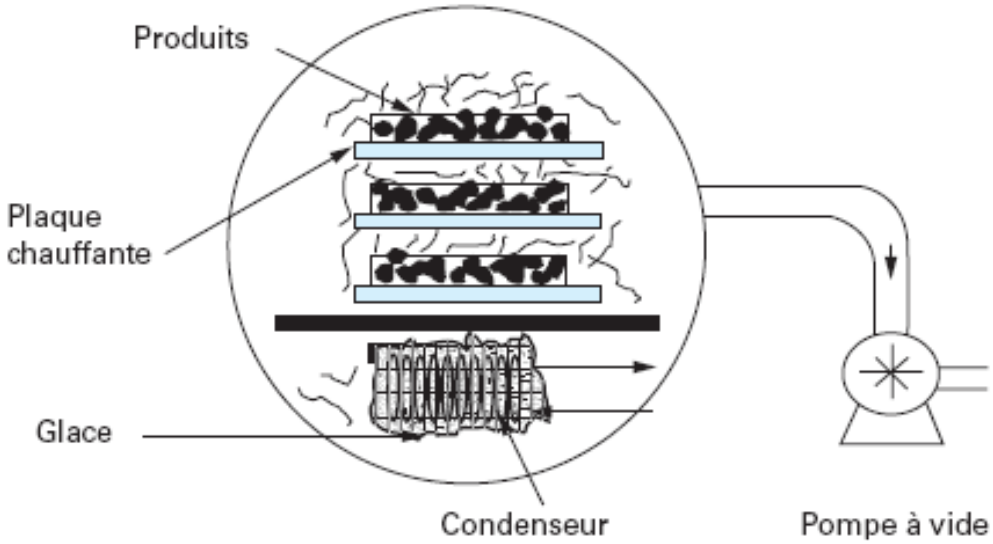


Figure 16 : Chambre de lyophilisation avec chauffage par conduction

Un lyophilisateur est constitué de trois éléments : une source chauffante, un piège de récupération de la vapeur d'eau et une pompe à vide. La source chauffante peut être apportée par conduction ou par convection. Dans le premier cas, elle est représentée par des plaques sur lesquelles sont déposés des plateaux contenant le produit. Au sein de ces plaques, circule un fluide caloporteur qui est refroidi lors de l'étape de congélation, puis chauffé au cours de la déshydratation (Figure 16). Dans le cas d'une source convective, le refroidissement se fait par

un courant d'air froid et le chauffage par rayonnement.

Le produit à lyophiliser est disposé dans des plateaux à l'intérieur de la chambre de lyophilisation sur des rails superposés. Une fois terminée l'étape de congélation, la pompe à vide est mise en route pour extraire les gaz incondensables. La pompe à vide permet l'abaissement de la pression totale dans la chambre de lyophilisation puis son maintien, pendant toute la déshydratation, à des valeurs compatibles avec les conditions de sublimation. La récupération de la vapeur d'eau se fait usuellement sur un point froid qui assure l'abaissement de la pression de vapeur d'eau (condenseur)[22].

La lyophilisation est une technologie coûteuse avec des frais d'investissement et de fonctionnement élevés (consommation énergétique de 1 500 à 2 500 kWh par tonne d'eau à éliminer[22]). Ces derniers sont générés par une faible productivité due à son fonctionnement sous vide qui implique un mode discontinu, ce qui provoque des durées importantes de traitement. Néanmoins, cette technologie présente l'avantage de ne pas impliquer des températures élevées, ce qui évite la dégradation des molécules sensibles aux hautes températures.

Ainsi, cette technologie de lyophilisation trouve sa place dans le séchage des produits ayant une forte valeur ajoutée, comme c'est le cas pour les industries pharmaceutiques avec les vaccins, le sérum et les médicaments ou des bio-industries avec les levains. Le procédé de lyophilisation permet ainsi d'obtenir la propriété la plus caractéristique de la technique, à savoir la conservation d'un principe actif (activité biologique et/ou médicamenteuse) dans un produit qui sera stocké à température proche de l'ambiante.

3.4.1.2 Atomisation

Le procédé d'atomisation a pour but de transformer une formulation liquide en une forme de microparticules sèches. A la différence de la lyophilisation, cette technologie peut se réaliser en continue et s'applique uniquement aux milieux liquides : une solution, une émulsion ou une suspension[23].

L'atomisation comprend quatre étapes séquentielles : la nébulisation de la formulation liquide, suivie par une mise en contact de l'aérosol (dispersion d'un liquide dans une phase

gazeuse) avec un flux d'air à une température contrôlée. Ceci générera un séchage rapide de l'aérosol pour former de petites particules solides qui seront enfin séparées de l'air porteur du solvant évaporé.

Un atomiseur est constitué d'une chambre de dessiccation en tour, au sommet de laquelle la formulation liquide initiale est nébulisée. La nébulisation s'effectue soit par passage à travers une buse d'atomisation pneumatique ou ultrasonore, soit par un système de type disque tournant ou buse rotative[24]. Les gouttelettes formées entrent en contact avec un flux d'air établi à cocourant, préalablement filtré et chauffé. Les microparticules se forment dans la chambre de dessiccation par vaporisation rapide et entraînement du solvant. Elles sont collectées à la base de cette chambre après séparation du flux d'air par passage dans un cyclone (Figure 17)[20].

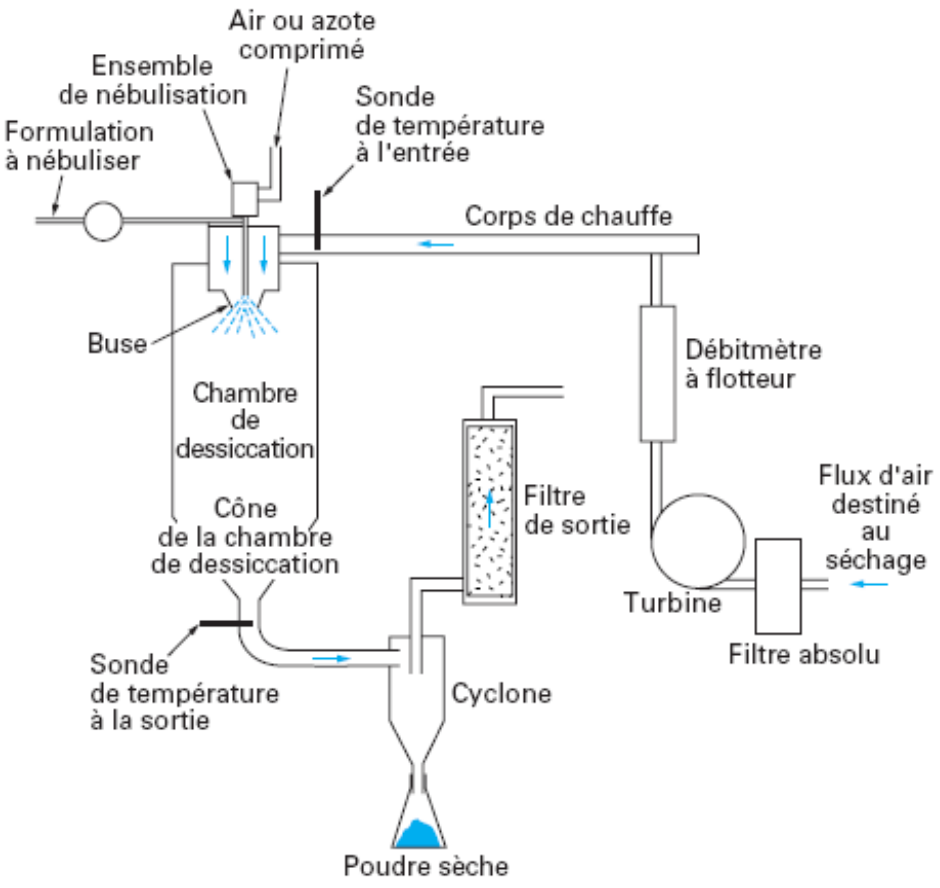


Figure 17 : Schéma d'un atomiseur

3.4.2 Comparaison entre la lyophilisation et l'atomisation dans le séchage d'émulsions huile dans l'eau

Les deux technologies de déshydratation qui viennent d'être présentées sont couramment employées pour sécher des émulsions. Nous trouvons dans la littérature de nombreux exemples[23, 25-28]. Cependant, les émulsions déshydratées séchées, sont dans la plupart des cas réalisées à partir de systèmes formulés.

Ce que nous proposons, c'est d'appliquer ces technologies à une émulsion constituée par des produits naturels qui sont rassemblés de façon spontanée lors du procédé intégré. Nous évaluerons si notre émulsion huile dans l'eau stabilisée par des phospholipides et protéines résistera à la déshydratation provoquée par ces deux technologies. Celles-ci provoquent en effet des changements importants en température qui peuvent dégrader les tensioactifs ainsi que la structure des gouttelettes.

Une de nos préoccupations dans cette étape de déshydratation, c'est la résistance des gouttelettes aux phénomènes de floculation ou coalescence. Pour cela, nous avons choisi des vitesses de congélation et chauffage peu élevées afin de minimiser les chocs thermiques qui peuvent perturber la stabilité des gouttelettes. De plus, nous avons dilué l'émulsion de telle sorte que les gouttelettes soient plus dispersées les unes par rapport aux autres et amoindrir ainsi leur agrégation lors de la sublimation de l'eau pendant la lyophilisation. Cette dilution facilitera l'alimentation du milieu dans l'atomiseur en diminuant sa viscosité.

P.6 <u>Séchage par lyophilisation</u>

L'émulsion obtenue lors du procédé intégré avec 20 % de graines de colza est diluée dans l'eau distillée avec un rapport de 1:5 v/v, à l'aide du mélangeur Silverson L4RT pour obtenir un milieu homogène. Ce mélange est placé dans des plateaux qui vont ensuite être placés à l'intérieur du lyophilisateur Cryo-Rivoire. Après fermeture de la porte et de la vanne de cassage du vide, le programme est lancé. Ce programme commence par une congélation avec une rampe de température de -0,5 ºC/min jusqu'à atteindre -40 ºC. Ensuite, un vide de 0,3 mbar est appliqué dans la chambre de lyophilisation. Enfin un échauffement avec une rampe de 0,5 ºC/min est appliqué jusqu'à ce que le produit soit à une température de 20 ºC.

P.7 Séchage par atomisation

L'émulsion obtenue lors du procédé intégré avec 20 % de graines de colza est diluée dans l'eau distillée de façon à obtenir une solution qui contient 5 % de matière sèche. Le milieu est homogénéisé à l'aide du mélangeur Silverson L4RT. L'alimentation du milieu dans l'appareil se fait avec un débit de 20 % de la capacité de la pompe, ce qui équivaut à 5,5 mL/min. L'air qui entraîne la vapeur d'eau présente un débit de 473 L/h et une température de 135 ºC. Grâce à tous ces paramètres, une température de 90 °C est obtenue à la sortie de la chambre de dessiccation.

Les produits obtenus après lyophilisation ou atomisation sont des poudres sèches. Nous caractériserons ces émulsions sèches par leur composition chimique ainsi qu'avec des observations en microscopie électronique et optique. De même, des réhydratations de ces poudres sont effectuées de façon à évaluer l'influence physique et chimique de ces opérations physiques sur le produit reconstitué.

P.8 Réhydratation des émulsions sèches

L'émulsion sèche est mise en contact avec l'eau dans une telle proportion qu'on puisse retrouver l'émulsion récupérée lors du procédé intégré (40%/60% émulsion/eau). Ensuite, le tout est mélangé à l'aide d'un vortex. Des observations à l'aide du microscope optique sont réalisées sur le produit réhydraté.

3.4.2.1 Caractérisation de l'émulsion déshydratée par lyophilisation

La composition de l'émulsion déshydratée par lyophilisation est indiquée dans le Tableau 15. Nous confirmons la présence des constituants d'oléosomes : lipides, oléosines et phospholipides. Les oléosines et phospholipides ne sont pas dosés directement mais ces molécules sont quantifiées avec les protéines totales et le phosphore total. La teneur en eau n'est pas négligeable. Cependant, des mesures d'activité de l'eau, qui est définie comme le rapport entre la pression de vapeur du produit et de l'eau pure à une même température, ont permis de constater une activité de 0,49. Celle-ci, selon la littérature[29], est suffisamment basse pour inhiber le développement microbien.

Tableau 15 : Composition de l'émulsion déshydratée par lyophilisation

Fractions	Emulsion
% Eau	15,0 ± 0.9
% Lipides	73,1 ± 0,7
% Protéines	13,6 ± 0,2
% Phosphore*	0,7 ± 0,1

* Pourcentage en phosphore total

En plus de sa composition chimique, nous avons voulu connaître la structure microscopique de l'émulsion sèche. Celle-ci nous permettra de mieux comprendre l'influence de la déshydratation sur la structure et l'arrangement des oléosomes. Pour cela, nous avons fait des observations au microscope électronique à balayage de l'émulsion sèche. Les deux images de la Figure 18 correspondent au produit obtenu par lyophilisation. Celles-ci correspondent à deux grossissements différents (x 2 500 et x 50 respectivement). Dans l'agrandissement plus important, des gouttelettes peuvent être distinguées malgré la couche qui les enveloppe et qui donne une apparence plus ou moins lisse aux surfaces. Cette couche est certainement formée par les constituants non membranaires contenus dans la phase continue de l'émulsion. Ainsi, quand l'eau est sublimée, ces constituants restent dans le milieu pour enrober les oléosomes. Sur l'image à plus faible grossissement, nous observons des structures bien organisées comme résultat des cavités produites par la cristallisation de l'eau lors de la congélation.

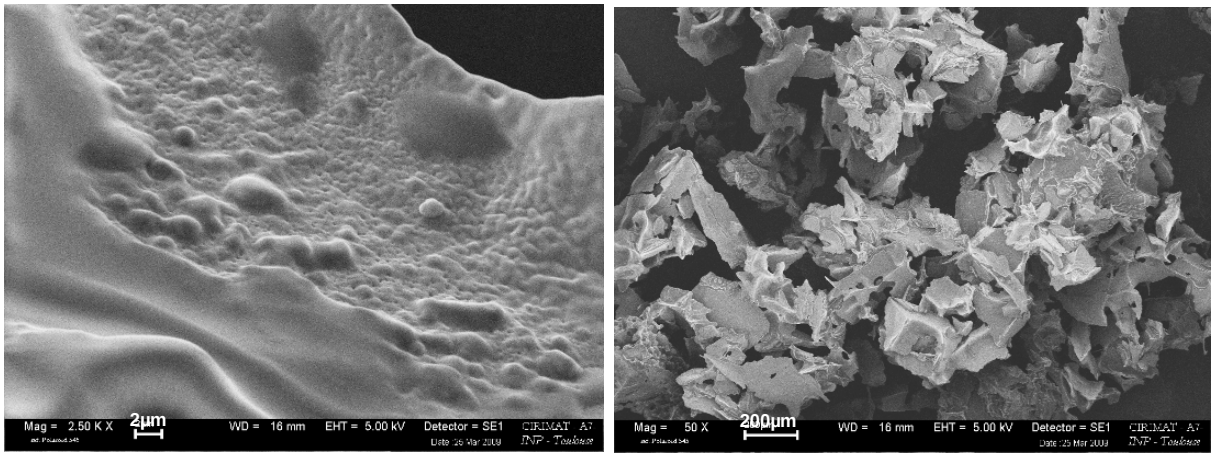


Figure 18 : Images obtenues par microscopie électronique à balayage de l'émulsion sèche par lyophilisation à différents grossissements

Après le séchage de l'émulsion, il est important d'évaluer sa capacité à se réhydrater. La Figure 19, montre deux images obtenues par microscopie optique où nous observons

l'effet de la lyophilisation sur l'émulsion. Nous remarquons l'apparition de gouttelettes qui ont coalescé pour engendrer des gouttelettes avec une taille moyenne de 5 µm.

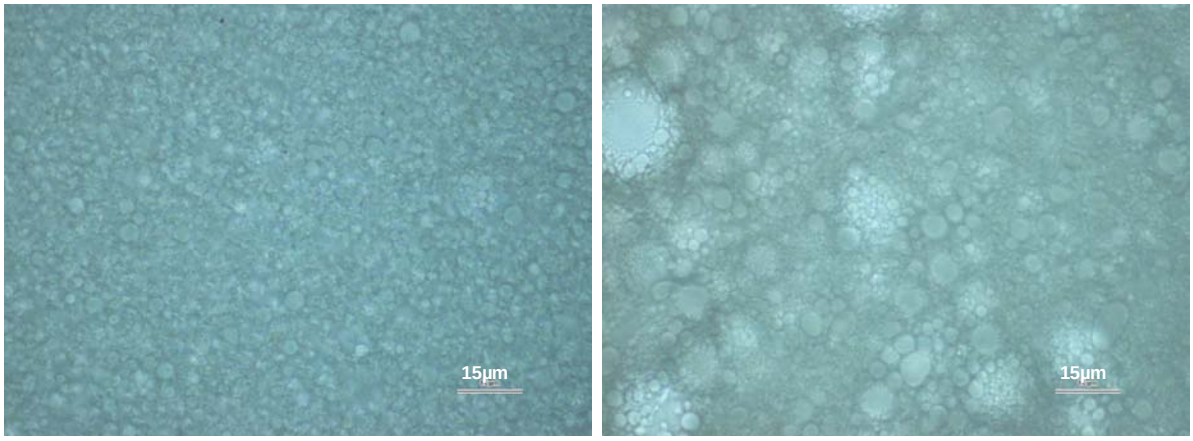


Figure 19 : Observations microscopiques x 1 000 (objectif à immersion dans l'huile) de l'émulsion fraîche (gauche) et l'émulsion reconstituée après lyophilisation (droite). L'échelle représente 15 µm

3.4.2.2 Caractérisation de l'émulsion déshydratée par atomisation

Maintenant, si nous observons la composition de l'émulsion séchée par atomisation (Tableau 16), nous remarquons une teneur en eau moindre que dans l'émulsion séchée par lyophilisation. Ceci explique les légères augmentations dans les pourcentages des autres constituants.

Tableau 16 : Composition de l'émulsion séchée par atomisation

Fractions	Emulsion
% Eau	7,0 ± 0,2
% Lipides	75.8 ± 0,8
% Protéines	13,9 ± 0,2
% Phosphore*	0,8 ± 0,1

* Pourcentage en phosphore total

Regardons les images obtenues par microscopie électronique à balayage. Les deux images de la Figure 20 correspondent à l'émulsion sèche issue de l'atomisation, avec des grossissements de x 5 000 et x 750 respectivement. Les gouttelettes sont mieux distinguées malgré la présence d'agrégats. Ceci est le résultat de la présence des protéines faiblement chargées. En effet, le Chapitre 2 a montré que cet effet d'agrégation des gouttelettes se produit en présence de protéines qui sont proches de leur point isoélectrique.

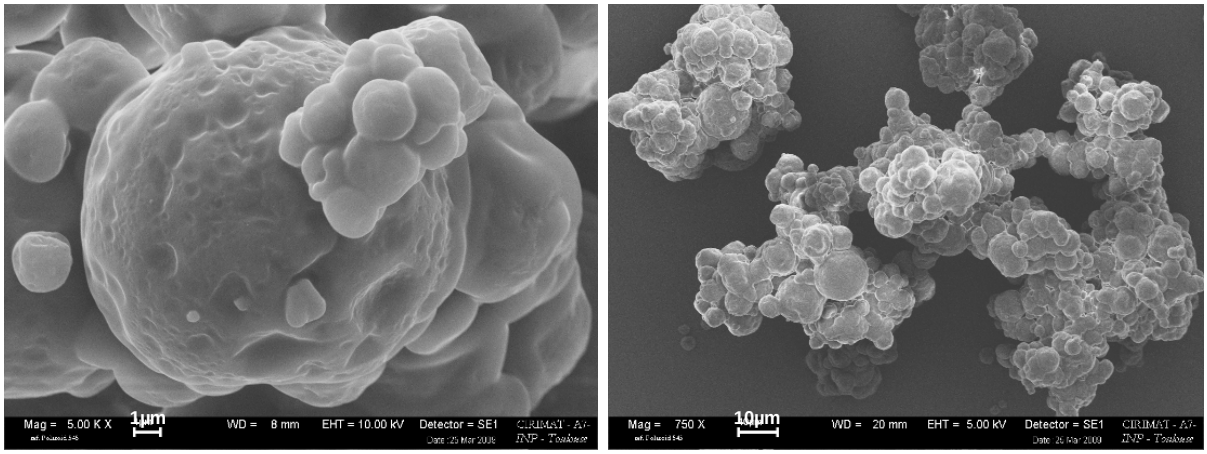


Figure 20 : Images obtenues par microscopie électronique à balayage de l'émulsion séchée par atomisation à différents grossissements

En regardant les images prises lors des observations microscopiques, la Figure 21 illustre la réhydratation de l'émulsion séchée par atomisation. Nous observons une émulsion moins poly-disperse que celle obtenue après lyophilisation. Néanmoins, nous observons aussi la présence de gouttelettes floculées de même qu'une taille moyenne des gouttelettes de 2,7 µm, plus importante que celles de l'émulsion fraîche.

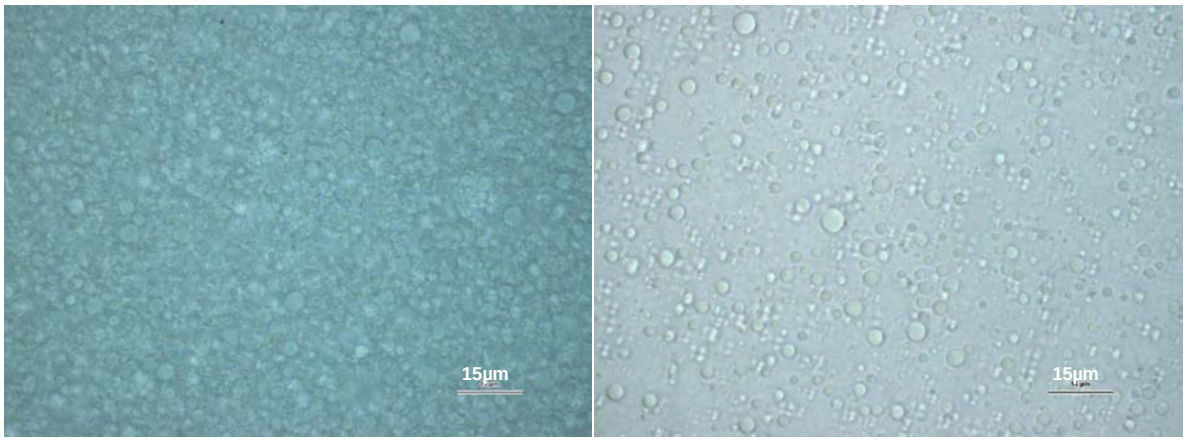


Figure 21 : Observations microscopiques x 1 000 (objectif à immersion dans l'huile) de l'émulsion fraîche (gauche) et l'émulsion reconstituée après atomisation (droite). L'échelle représente 15 µm

3.4.2.3 Comparaison des techniques de séchage de l'émulsion

Comme nous avons pu le constater, l'aspect microscopique des émulsions sèches obtenues par les deux technologies de séchage est différent. Cependant, leur composition, d'après nos analyses reste très similaire, avec la seule différence d'une teneur un peu plus

importante en eau pour l'émulsion obtenue par lyophilisation.

Figure 22 : Images des émulsions séchées par atomisation (gauche) et lyophilisation (droite)

La Figure 22 montre aussi une différence macroscopique entre les deux émulsions sèches. Nous observons une différence dans la couleur du produit : un jaune paille très similaire à la couleur de l'émulsion fraîche dans le produit atomisé et un peu plus sombre pour le produit lyophilisé. Nous avons plusieurs hypothèses pour expliquer cela. Nous pouvons relier cette différence à la teneur plus importante en eau et l'état de surface différent du produit lyophilisé. Cela peut en effet provoquer une absorption plus importante de la lumière et diminuer ainsi l'intensité de la lumière diffusée. Rappelons que la teneur en eau du produit issu de l'atomisation ne dépasse pas 7 % tandis que celle du produit issu de la lyophilisation est comprise autour de 15 %. Nous pensons également que l'eau favorise l'oxydation de certains composés.

Par rapport à la morphologie, nous remarquons que si l'émulsion séchée par atomisation présente une apparence poudreuse, l'émulsion séchée par lyophilisation a plutôt l'aspect d'une éponge. Cet aspect plus aéré donne au produit une densité apparente moins importante que pour l'émulsion atomisée. Ceci est une conséquence de tous les espaces vides créés lors de la sublimation de l'eau. Nous avons aussi remarqué d'après les images obtenues en microscopie électronique à balayage que les tailles des gouttelettes sont supérieures à 1 µm pour les deux techniques de séchage. Malgré quelques coalescences importantes, la plupart des gouttelettes conservent le même ordre de grandeur. Cette augmentation peut être aussi associée à la couche de constituants non membranaires qui enrobe les oléosomes, comme aussi à une possible dilatation des structures due au vide généré et nécessaire lors des

analyses.

Parallèlement aux observations au microscope électronique à balayage, nous avons réalisé des observations en microscopie optique de ces émulsions sèches (Figure 23). Elles nous confirment les résultats acquis en microscopie électronique. Nous observons un produit qui est organisé autour du réseau cristallin formé par la congélation de l'eau dans le cas de la lyophilisation, pendant que, pour l'atomisation, le produit forme des agrégats de structures plus petites. Il en découle que les émulsions sèches sont organisées différemment selon la technique de séchage. Un réseau cristallin structure l'émulsion sèche obtenue par déshydratation après lyophilisation, tandis que des agrégats supramoléculaires assemblent les particules des émulsions séchées par atomisation.

Figure 23 : Observations microscopiques x 400 avec la lumière polarisée des émulsions séchées obtenues par lyophilisation (à gauche) et par atomisation (à droite). L'échelle représente 100 µm

En plus des observations microscopiques, nous observons que la réhydratation du produit atomisé est plus facile que celle du produit lyophilisé et nous observons ensuite un crémage plus rapide à l'œil nu. De plus, la capacité d'adsorption d'eau, obtenue par des isothermes d'adsorption (Figure 24), de ces deux produits montre que l'émulsion lyophilisée ne peut adsorber que 6,2 % d'eau par rapport à sa masse, alors que l'émulsion atomisée peut adsorber 8,2 %.

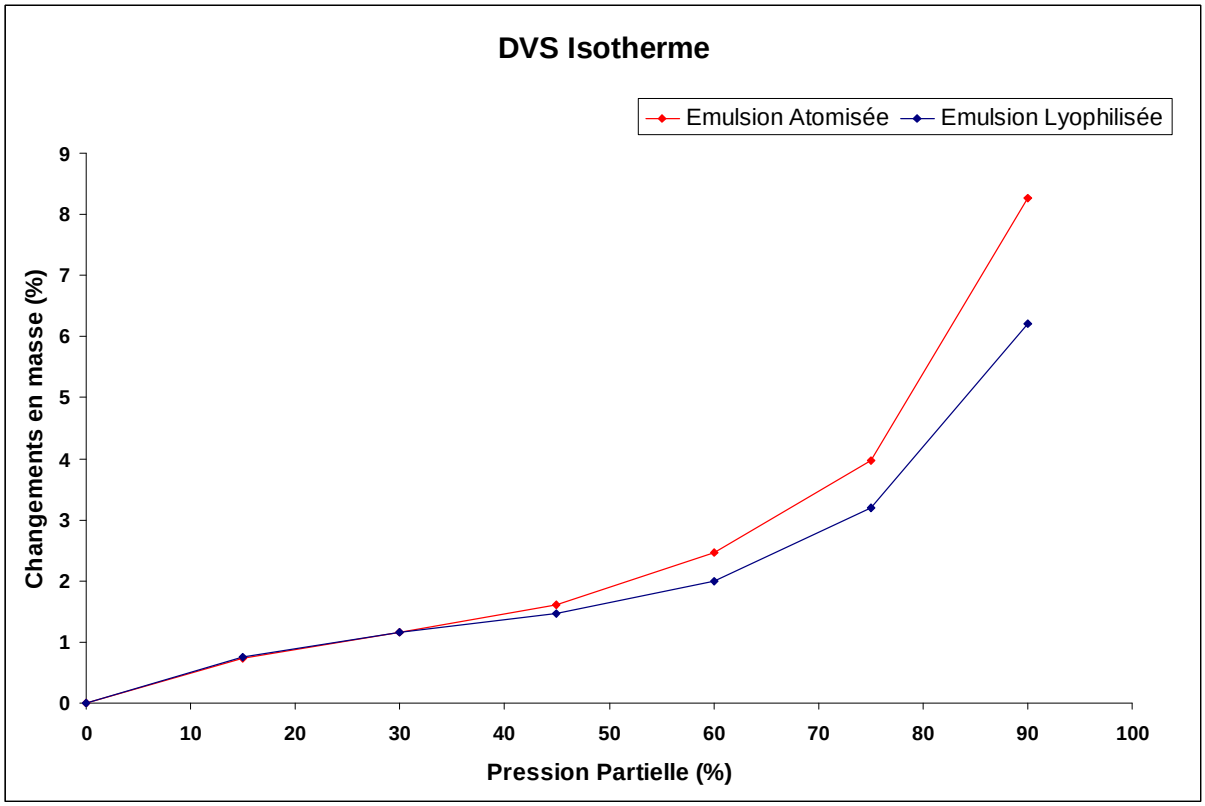


Figure 24 : Isothermes d'adsorption pour les émulsions séchées par lyophilisation et atomisation

3.4.3 Amélioration de la réhydratation de l'émulsion sèche

L'objectif des travaux concerne la reconstitution de l'émulsion fluide à partir de l'émulsion sèche. Le verrou scientifique est la capacité à réhydrater complètement cette émulsion. Nous allons nous atteler à cette étude. Le fait de ne pas obtenir une émulsion réhydratée qui soit comparable à l'émulsion fraîche nous oblige à chercher des améliorations. Pour cela, nous allons étudier les paramètres susceptibles d'influencer :

- le changement dans le pouvoir ionique des protéines qui sont comprises dans les constituants non membranaires lors de la réhydratation,
- l'ajout d'un agent protecteur lors du séchage de l'émulsion, et
- l'emploi d'un outil mécanique lors de la réhydratation

3.4.3.1 Modification du pH

Comme nous l'avons constaté dans le Chapitre 2, les constituants non membranaires participent fortement à la déstabilisation de l'émulsion par floculation. Le plus simple serait d'éliminer leur présence. Cependant, nous avons observé qu'ils sont nécessaires dans l'étape de séchage de l'émulsion (voir Section 3.4.3.3). Une autre façon de contourner cette problématique consiste à modifier la charge globale des protéines, en modifiant le pH. Pour cela nous avons décidé d'observer l'impact du pH dans la réhydratation de l'émulsion sèche. Pour cette étude nous avons utilisé l'émulsion séchée par lyophilisation, car c'est celle qui répond le moins bien à l'hydratation. Lors de cette étude, nous avons suivi le crémage dans les échantillons.

P.9 Réhydratation des émulsions en modifiant le pH

Nous avons préparé les différentes émulsions en réhydratant l'émulsion séchée par lyophilisation avec de l'eau déminéralisée pour obtenir une émulsion contenant 10 % de matière sèche. Le pH de l'émulsion est de 5,5. Ensuite, le pH est ajusté avec des ajouts de solutions de HCl ou NaOH. Tous les échantillons sont agités à l'aide d'un vortex.

D'après ces réhydratations, nous ne constatons pas d'effet positif dans la stabilité physique de l'émulsion aux pHs acides compris entre 2 et 6. C'est à partir du pH 7 que le crémage de l'émulsion réhydratée est plus lent. La Figure 25 montre une image prise deux heures après préparation des différentes émulsions réhydratées. Nous remarquons une bonne stabilité de l'émulsion autour d'un pH de 8.

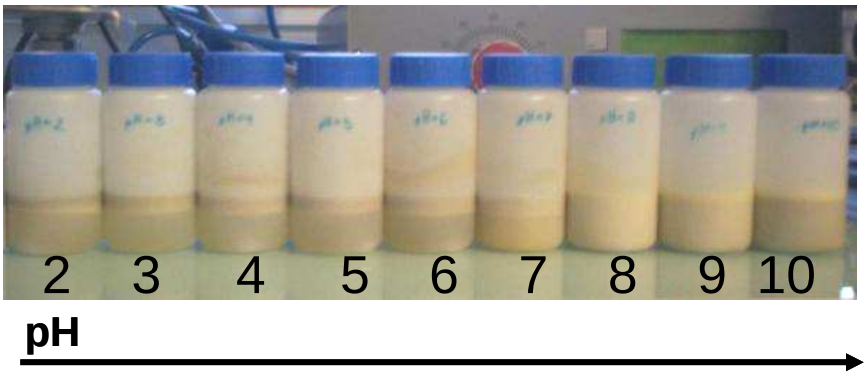


Figure 25 : Aspect visuel des émulsions réhydratées à différents pHs

D'après ces résultats, nous constatons que si nous voulons obtenir une émulsion qui puisse se réhydrater et présenter une bonne stabilité physique, il est nécessaire de modifier le pH du produit. Comme un de nos souhaits est l'obtention d'un produit prêt à l'emploi, nous avons décidé d'ajuster le pH avec un tampon. Nous avons ainsi choisi le trishydroxyméthylaminométhane, couramment abrégé en Tris (voir Figure 26). Cette molécule est largement utilisée comme tampon en biochimie, pour travailler dans un intervalle de pH entre 6.5 et 9.7 et avec un pKa de 8,1 à 25 ºC. En plus, ce réactif pur a un état cristallin, ce qui nous permet de l'ajouter à l'émulsion en poudre sans perdre l'avantage de stocker un produit solide.

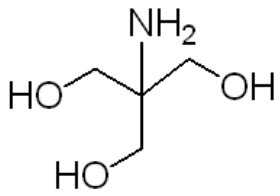


Figure 26 : Formule du trishydroxyméthylaminométhane

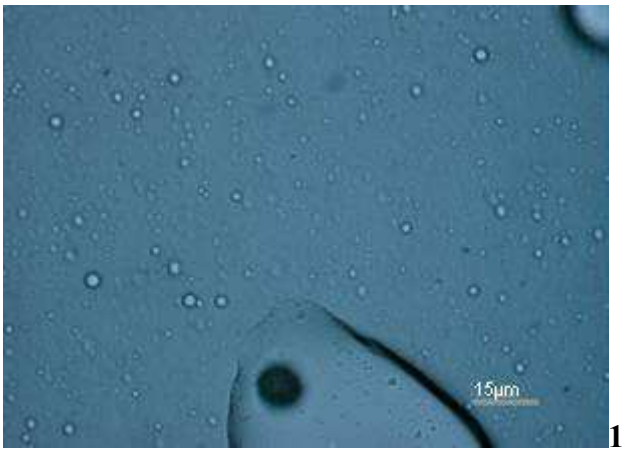
3.4.3.2 Effet d'outils mécaniques

Nous avons voulu observer l'effet que peuvent apporter différents outils dans l'hydratation du produit. Pour cela, nous avons utilisé l'émulsion sèche obtenue par lyophilisation.

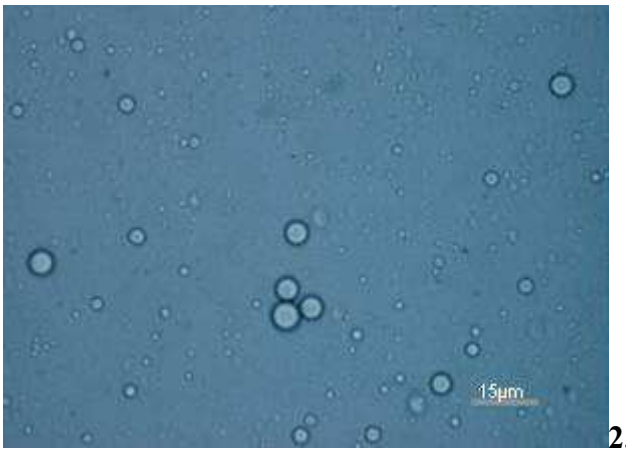
P.10 Protocole

L'émulsion sèche est mise en contact avec une solution de Tris 75 mM dans une proportion de 5/95 w/w. Ensuite, l'ensemble est mélangé avec des outils différents : un vortex, un ultra turrax et l'homogénéisateur haute pression. Des observations du produit réhydraté à l'aide du microscope optique sont réalisées.

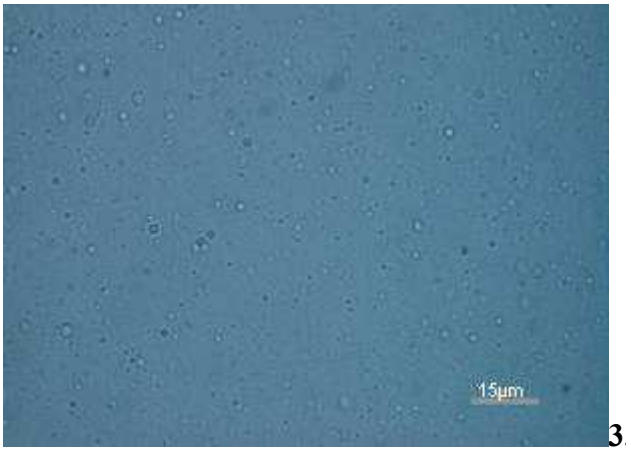
La Figure 27 illustre comment l'application d'une force mécanique peut améliorer la réhydratation de l'émulsion sèche, en diminuant la taille des gouttelettes qui ont coalescé. Le simple ajout du tampon, associé à l'effet mécanique, nous permet de trouver un milieu qui présente moins d'agrégats.



1.



2.



3.

Figure 27 : Observations microscopiques x 1 000 (objectif à immersion dans l'huile) des émulsions réhydratées dans une solution de Tris à 75 mM et associées à un effet mécanique : **1.** vortex (témoin), **2.** 1 min ultra turrax et **3.** 1 passage d'homogénéisation à 350 bar

3.4.3.3 Ajout d'agents protecteurs

Dans la littérature, nous pouvons lire que l'ajout de certaines molécules semble avoir un effet protecteur lors du séchage en améliorant la qualité du produit final[23, 30, 31]. Par conséquent, nous avons décidé de faire des essais dans lesquels une sucre un tampon et du

glycérol, sont ajoutés à l'émulsion de façon à améliorer le séchage de l'émulsion en évitant la coalescence des gouttelettes et/ou en favorisant sa réhydratation. Les produits choisis ont été le glycérol, le mannitol et le Tris. De même, une émulsion appauvrie en protéines non membranaires a été testée.

P.11 Protocole

L'émulsion obtenue lors du procédé intégré avec 20 % de graines de colza est diluée dans l'eau distillée de façon à obtenir une solution qui contient 5 % de matière sèche. Ensuite le produit à tester est ajouté à la concentration qui indique le Tableau 17. Le milieu est homogénéisé à l'aide du mélangeur Silverson L4RT pour obtenir un milieu homogène. Enfin, ce mélange est séché par une des deux technologies selon leurs propres protocoles déjà décrits auparavant.

Le Tableau 17 illustre les conditions des expériences réalisées pour améliorer la réhydratation de l'émulsion sèche, ainsi que l'aspect visuel de celles-ci après séchage.

Tableau 17 : Conditions des expériences réalisées pour améliorer la réhydratation de l'émulsion sèche ainsi que les remarques observées à la fin du séchage

No. Expérience	Technique de Séchage	Particularité	Concentration	Remarques à la fin du séchage
1	Atomisation	Ajout de Glycérol	1 % en poids	Poudre jaune foncé
2	Atomisation	Ajout de Mannitol	20 mM	Poudre jaune brun
3	Atomisation	Ajout de Tris	75 mM	Poudre marron clair
4	Atomisation	Lavage de protéines non membranaires	-	Nous n'obtenons pas une poudre
5	Lyophilisation	Ajout de Glycérol	1 % en poids	Poudre humide
6	Lyophilisation	Ajout de Mannitol	20 mM	Poudre humide
7	Lyophilisation	Ajout de Tris	75 mM	Poudre jaune foncé
8	Lyophilisation	Lavage de protéines non membranaires	-	Nous n'obtenons pas une poudre

Nous pouvons observer que les différents produits ont un effet dans l'aspect final de l'émulsion sèche. Ces différences se traduisent en une émulsion sèche avec une couleur plus foncée ainsi qu'une poudre plus grossière. Dans le cas de l'émulsion récupérée après lavage de protéines non membranaires, le produit obtenu après séchage ne correspond pas à une

poudre, des gouttes d'huile sont d'ailleurs observées à l'œil nu. Ces constituants non membranaires possèdent un rôle protecteur des oléosomes, leur absence se manifeste dans une fragilisation du système, ce qui génère la coalescence des gouttelettes.

P.12 Protocole

L'émulsion sèche est mise en contact avec l'eau dans une proportion de 5/95 w/w. Ensuite, l'ensemble est mélangé à l'aide un ultra turrax pendant 5 min à une vitesse de 13 000 tr/min. La taille des gouttelettes est déterminée par microscopie optique.

Maintenant observons l'effet de ces modifications sur la réhydratation de l'émulsion. Le Tableau 18 illustre la taille moyenne des gouttelettes et la présence des agrégats observés en microscopie optique lors de la réhydratation des différentes émulsions séchées. Nous remarquons que l'ajout du tampon Tris permet de conserver la taille originale des gouttelettes en restant très proche de la taille de l'oléosome, alors que l'ajout de glycérol ou de mannitol augmente cette valeur. De plus, lors de l'ajout du tampon Tris, les gouttelettes ne floculent pas (absence d'agrégats), ce qui se traduit par une stabilité au crémage.

Tableau 18 : Taille moyenne des gouttelettes observée lors des réhydratations des émulsions sèches

Emulsion	Taille de Gouttelette [µm]	Présence d'agrégats
Sans ajout	1,0	Oui
Ajout de Glycérol	1,9	Oui
Ajout de Mannitol	3,6	Oui
Ajout de Tris	0,9	Non

3.5 Emulsion issue du procédé intégré comme biolubrifiant

L'intérêt du projet européen IBIOLAB, est de créer des produits lubrifiants qui puissent obtenir un écolabel. Pour cela, le produit doit présenter une bonne biodégradabilité ainsi qu'une bonne performance, sans perdre de vue le cycle de vie du produit. Ainsi, nous avons compté avec la collaboration de partenaires du projet, qui sont spécialistes du monde des lubrifiants, parmi eux nous pouvons particulièrement citer Tekniker et l'Iterg. Il est important de remarquer que les résultats qui sont présentés ici, ont été obtenus avec des émulsions séchées par lyophilisation.

3.5.1 Caractérisation de produits

L'Iterg (Institut des Corps Gras à Pessac), a été en charge de la caractérisation physico-chimique du produit. C'est ainsi que ce partenaire a réalisé la caractérisation de l'émulsion lyophilisée. Les analyses ont reporté une teneur en lipides de cette émulsion sèche égale à 72,7 %, ainsi qu'une teneur en phosphore dans cette fraction de 101 ppm et un taux de peroxydes de 2,1 meq O_2/kg. Egalement, la composition en acides gras de la fraction lipidique obtenue à partir de l'émulsion lyophilisée a été déterminée (Tableau 19). Ces compositions correspondent aux caractéristiques de l'huile de colza, ce qui confirme la stabilité des propriétés de l'huile au cours du procédé intégré et séchage.

Tableau 19 : Profil d'acides gras dans l'émulsion lyophilisée (pourcentage massique)

Acide gras	% dans l'extrait lipidique de l'émulsion lyophilisée
12 : 0	0,1
14 : 0	0,1
16 : 0	4,9
16 : 1	0,3
18 : 0	1,6
18 : 1	61,4
18 : 2	20,2
18 : 3	9,1
20 : 0	0,6
20 : 1	1,2
22 : 0	0,3
22 : 1	
24 : 0	0,3
24 : 1	0,1
Non identifié	-0,2

Sur cet extrait lipidique, des analyses des constituants mineurs ont été réalisées. Le Tableau 20 compile les résultats des analyses effectués sur l'émulsion lyophilisée. Nous ne constatons pas une diminution dans la teneur ni dans la composition de tocophérols dans le produit après séchage.

Tableau 20 : Résultats de l'analyse de tocophérols dans l'émulsion lyophilisée

Tocophérols		mg /kg de lipides	Composition (%)
Tocophérol	α	291	39,1
	β	2	0,3
	γ	445	59,8
	δ	6	0,8
Tocophérol Total		**744**	**100**

Des analyses de stérols ont également été réalisées sur l'émulsion lyophilisée (Tableau 21). Dans ce tableau la teneur en stérol et leurs pourcentages massiques sont déterminés. Nous remarquons que les proportions de brassicastérol, de campestérol et de β sitostérol restent majoritaires et dans des proportions équivalentes à celles qui ont été signalé précédemment dans ce chapitre (Tableaux 2 et 12).

Tableau 21 : Résultats de l'analyse de stérols dans l'émulsion lyophilisée

Stérols	% dans l'extrait lipidique de l'émulsion lyophilisée
Cholestérol	0,2
Brassicastérol	15,6
24 Meth. Cholesterol	1,3
Campestérol	31
Campestanol	0,1
Stigmastérol	0,4
Δ7 Campestérol	0,1
Δ5,23 Stigmastadienol + Clerosterol	2,1
β Sitostérol	46,5
Stigmastanol	0,2
Δ5 Avenastérol	2,1
Δ5,24 Stigmastadienol	0,3
Δ7 Stigmastérol	<0,1
Δ7 Avenastérol	<0,1
Non Identifié	0,1
Stérol totaux (mg/100g de produit)	**824**

3.5.2 Toxicité et Biodégradabilité

Une de caractéristiques primordiales pour qu'un produit puisse obtenir un écolabel est qu'il ne soit pas toxique ni dangereux, mais qu'aussi il présente une compatibilité avec l'environnement de façon à ce qu'il puisse se dégrader. Ainsi, des analyses sur l'émulsion lyophilisée comme sur le Tris ont été réalisées par Tekniker. La toxicité de ces produits a été déterminé par deux méthodes normalisées : une qui emploie un crustacé appelé Daphnia Magna et une autre qui utilise des algues vertes. Ces deux organismes sont exposés aux produits de façon à évaluer leur toxicité.

P.13 Test OECD 202

De jeunes daphnies, âgées de moins de 24 heures au début de l'essai, sont exposées à une gamme des concentrations de la substance d'essai pendant une période de 24 heures. L'immobilisation du crustacé est enregistrée au bout de 24 heures et comparée aux valeurs contrôles. Les résultats sont analysés afin de calculer la EL_{50}. Cette valeur représente la concentration du produit testé pour laquelle 50 % de daphnies sont incapables de nager après 24 heures.

P.14 Test OECD 201

Des cultures d'algues vertes (Selenastrum capricornutum), sont exposées à une gamme des concentrations de la substance d'essai pendant une période de 72 heures. L'inhibition de leur croissance est quantifiée par densité optique à une longueur d'onde de 670 nm. Les résultats sont analysés afin de calculer la EL_{50}. Cette valeur représente la concentration du produit testé pour laquelle on observe une diminution de 50 % dans la croissance ou la vitesse de croissance par rapport au contrôle.

Les résultats obtenus lors de ces tests, sont présentés dans les Tableaux 22 et 23.

Tableau 22 : Test OECD 202 "Daphnia Magna" The 24h EL_{50} Acute Immobilisation

Produit	EL_{50}	Classification
Tris	>1000 mg/L	Non toxique ni dangereux pour les organismes aquatiques
Emulsion	>1000 mg/L	Non toxique ni dangereux pour les organismes aquatiques

Tableau 23 : Test OECD 201, "Alga growth inhibition test"

Produit	EL_{50}	Classification
Tris	>100 mg/L	Non toxique ni dangereux pour les organismes aquatiques
Emulsion	>100 mg/L	Non toxique ni dangereux pour les organismes aquatiques

Les valeurs EL_{50} inférieures à 1000 mg/L et 100 mg/L pour les tests OECD 202 et OECD 201 respectivement, permettent de clarifier le Tris et l'émulsion lyophilisée comme Non toxique ni dangereux pour les organismes aquatiques.

Pour évaluer la biodégradabilité d'un produit, Tekniker emploie la méthode OECD 301F, qui permet de déterminer la biodégradabilité d'un produit.

P.15 Test OECD 301F

Un volume mesuré de milieu minéral inoculé, contenant une concentration connue de la substance d'essai (100 mg/L) comme la seule source de carbone organique, est remué dans une flasque fermée à une température constante (25 ± 1 ºC) pendant 28 jours. La consommation d'oxygène est déterminée, soit en mesurant la quantité d'oxygène nécessaire pour maintenir le volume constant du gaz dans la flasque respirometrique, soit par des changements de volume ou de pression dans l'appareil. La quantité d'oxygène prise par la population microbienne pendant la biodégradation de la substance d'essai (corrigée par un contrôle qui est réalisé en parallèle) est exprimée comme le pourcentage de DCO (demande chimique en oxygène).

Les résultats de ces analyses sont notés dans le Tableau 24. Pour qu'un produit soit considéré comme biodégradable, le pourcentage de dégradation doit être supérieur ou égal à 60 %. D'après ces résultats, nous confirmons la biodégradabilité de l'émulsion lyophilisée, cependant le tampon tris tout seul n'est pas considéré comme tel selon cette méthode. C'est pourquoi, des analyses ont été réalisées sur l'émulsion avec la quantité de Tris nécessaire pour la formulation, de façon à réduire la concentration de Tris dans le produit à analyser. Le résultat de ce dernier test est reporté sur le même tableau, et démontre la biodégradabilité du produit. Nous pouvons conclure d'après ces résultats, que nous sommes en présence d'un produit non toxique et biodégradable, qui sont des critères indispensables pour une

écolabellisation.

Tableau 24 : Test OECD 301F, "Manometric Respirometry Test"

Produit	% Biodégradation
Tris	≤ 60%
Emulsion	≥ 60%
Emulsion + Tris	≥ 60%

3.5.3 Performances tribologiques de la formulation

Tekniker a été en charge des tests qui évaluent la performance des produits proposés. Cette évaluation se fait grâce à des tests tribologiques qui permettent d'obtenir les coefficients de friction et d'usure d'un produit selon des tests normés.

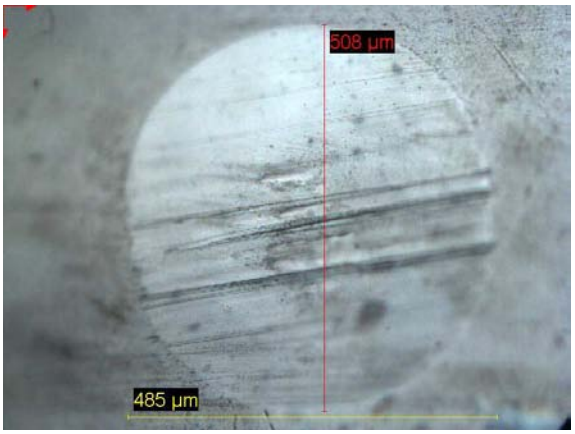
La formulation que nous avons proposée lors de cette étude, a été une émulsion contenant 5 % d'huile conditionnée avec Tris à une concentration de 75 mM. La teneur en huile a été proposée par les mêmes industriels qui participent dans ce projet, pendant que la concentration de Tris a été fixée par nous-même après des tests de mise au point.

P.16 <u>Préparation de la formulation</u>

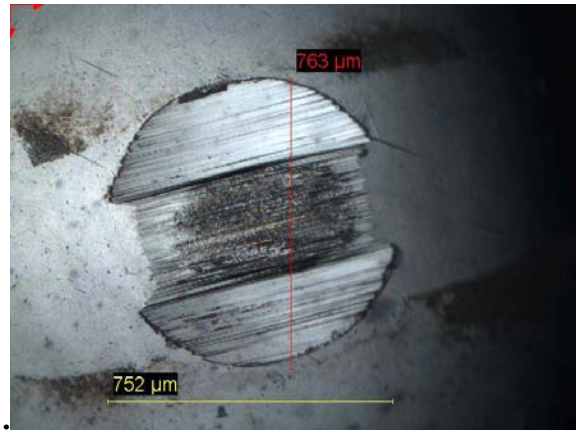
L'émulsion sèche est mise en contact avec une solution Tris 75 mM dans une proportion de 5/95 w/w. Ensuite, le tout est mélangé à l'aide de l'homogénéisateur haute pression (un passage à 350 bars).

Les tests ont été réalisés à l'aide d'un tribomètre SRV utilisé avec la configuration « boule en disque ». Parallèlement, des tests ont été effectués en utilisant des émulsions de référence fournies par Doimak (partenaire IBIOLAB) : Une à base de 4 % d'huile minérale et une autre constituée par 4 % d'un fluide synthétique.

La Figure 28, illustre l'usure causée par la boule lors de ces tests. Nous remarquons une usure moins importante quand nous utilisons notre émulsion formulée. Ce qui démontre un meilleur comportement tribologique de celle-ci.



1.



2.

Figure 28 : Images qui montrent l'usure de boules employées lors du test SRV : **1.** Emulsion lyophilisée + Tris et **2.** Emulsion de référence d'huile minérale

Les paramètres tribologiques obtenus au cours de ces tests sont mentionnés dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Bilan des résultats obtenus lors de tests tribologiques

Produit	DIN 51834 à 50 N		Test « pin on disc »		
	COF	Trace d'usure (µm)	COF	ΔT (ºC)	Δ Ra (µm)
Emulsion de reference 1 (mineral based 4%)	0,32	748±14	0,63±0.06	52 ±1	1,80 ±0.28
Emulsion de reference 2 (synthetic fluid 4%)	N.D.	N.D.	0,31±0.01	24 ±3	2,39 ± 0.04
5% émulsion lyophilisée + Tris 75mM	0,12	501±7	0,20	20	1,26

N.D. Non Déterminé

Nous constatons que notre émulsion présente des coefficients de friction, des augmentations d'éraillure et des températures toujours inférieurs aux produits commerciaux testés comme référence, ce qui confirme la bonne performance de notre formulation.

Donc, nous pouvons conclure que notre formulation a des bonnes propriétés tribologiques en comparaison à d'autres émulsions dans le même ordre de concentration. Boschkova *et coll.*[32] avaient déjà montré que les systèmes organisés présentent de bonnes propriétés anti-usures avec de faibles coefficients de friction. Donc, il n'est pas étonnant que nos émulsions organisées présentent des bonnes propriétés.

3.6 Conclusions

Au cours de ce chapitre, nous avons réalisé et mis en œuvre un procédé intégré capable de libérer les lipides endogènes des graines oléoprotéagineuses par voie aqueuse sous forme d'émulsion directe. Ce procédé est possible grâce à un broyage aqueux suivi d'une séparation centrifuge. Nous avons pu constater l'importance de la réduction de la taille des particules des graines sur cette libération de lipides. L'émulsion, comme les coproduits générés à la fin du procédé, ont été analysés de façon à déterminer leurs compositions chimiques pour ainsi trouver des vois de valorisation.

Pour répondre au problème du développement microbien et assurer la stabilité de l'émulsion, nous avons pu formuler une émulsion à faible activité d'eau : une émulsion sous forme de poudre (après séchage de l'émulsion fluide) qui peut être ensuite réhydratée.

Enfin, il a été démontré, au vu des tests d'usure et d'extrême pression, que cette émulsion réhydratée se révèle performante comme lubrifiant par rapport à d'autres produits commerciaux. Elle est de plus biodégradable et non toxique selon des tests normés. Au final, le procédé intégré respecte les principes de la chimie verte. Tout ceci fait de cette formulation un bon candidat pour l'écolabellisation.

3.7 Références bibliographiques

1. Bockisch, M., *Fats and Oils Handbook*. **1998**, Champaign, Illinois: AOCS Press. p. 180.

2. Tuberoso, C.I.G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., and Cabras, P., *Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use.* Food Chemistry, **2007**. 103(4): p. 1494-1501.

3. Moreau, R.A., Whitaker, B.D., and Hicks, K.B., *Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses.* Progress in Lipid Research, **2002**. 41(6): p. 457-500.

4. Folmer, B.M., *Sterol surfactants: from synthesis to applications.* Advances in Colloid and Interface Science, **2003**. 103(2): p. 99-119.

5. Roche, J., Alignan, M., Bouniols, A., Cerny, M., Mouloungui, Z., and Merah, O., *Sterol concentration and distribution in sunflower seeds (Helianthus annuus L.) during seed development.* Food Chemistry. 119(4): p. 1451-1456.

6. Blazy, P., Yvon, J., and Jdid, E.-A., *Fragmentation : Aspects théoriques.* Techniques de l'ingénieur, (J 3050): p. 1-14.

7. Mechling, E., *Mise au point d'un réacteur multitâches adapté à la production des composés oléophiles à partir des milieux réactionnels issus des graines oléagineuses*. **2002**, INP: Toulouse.

8. Evon, P., *Nouveau procédé de bioraffinage du tournesol plante entière par fractionnement thermo-mécano-chimique en extrudeur bi-vis : étude de l'extraction aqueuse des lipides et de la mise en forme du raffinat en agromatériaux par thermomoulage*. **2008**, INP: Toulouse.

9. Evon, P., Vandenbossche, V., Pontalier, P.Y., and Rigal, L., *Direct extraction of oil from sunflower seeds by twin-screw extruder according to an aqueous extraction process: Feasibility study and influence of operating conditions.* Industrial Crops and Products, **2007**. 26(3): p. 351-359.

10. Geankoplis, C.J., *Transport Processes and Unit Operations*. **1978**: Allyn and Bacon. 650 pp.

11. Rosenthal, A., Pyle, D.L., and Niranjan, K., *Simultaneous Aqueous Extraction of Oil and Protein from Soybean: Mechanisms for Process Design.* Food and Bioproducts Processing, **1998**. 76(4): p. 224-230.

12. Campbell, K.A. and Glatz, C.E., *Mechanisms of Aqueous Extraction of Soybean Oil.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2009**. 57(22): p. 10904-10912.

13. Tzen, J.T.C., Peng, C.-C., Cheng, D.-J., Chen, E.C.F., and Chiu, J.M.H., *A New Method for Seed Oil Body Purification and Examination of Oil Body Integrity Following Germination.* The Journal of Biochemistry, **1997**. 121(4): p. 762-768.

14. Wongkittipong, R., Prat, L., Damronglerd, S., and Gourdon, C., *Solid-liquid extraction of andrographolide from plants--experimental study, kinetic reaction and model.* Separation and Purification Technology, **2004**. 40(2): p. 147-154.

15. Tzen, J.T.C., Cao, Y., Laurent, P., Ratnayake, C., and Huang, A.H.C., *Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species.* Plant Physiology, **1993**. 101(1): p. 267-276.

16. White, D.A., Fisk, I.D., Mitchell, J.R., Wolf, B., Hill, S.E., and Gray, D.A., *Sunflower-seed oil body emulsions: Rheology and stability assessment of a natural emulsion.* Food Hydrocolloids, **2008**. 22(7): p. 1224-1232.

17. Iwanaga, D., Gray, D.A., Fisk, I.D., Decker, E.A., Weiss, J., and McClements, D.J., *Extraction and Characterization of Oil Bodies from Soy Beans: A Natural Source of Pre-Emulsified Soybean Oil.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**. 55(21): p. 8711-8716.

18. Huang, S.-W., Frankel, E.N., and German, J.B., *Antioxidant activity of .alpha.- and .gamma.-tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1994**. 42(10): p. 2108-2114.

19. Chen, G. and He, G., *Separation of water and oil from water-in-oil emulsion by freeze/thaw method.* Separation and Purification Technology, **2003**. 31(1): p. 83-89.

20. Richard, J. and Benoît, J.-P., *Microencapsulation.* Techniques de l'ingénieur, (J 2210): p. 1-20.

21. Dieter, H. and Jens, R., *Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase - Theory, Experiment, and Use.* Angewandte Chemie International Edition, **2001**. 40(23): p. 4330-4361.

22. Marin, M. and René, F., *Lyophilisation.* Techniques de l'ingénieur, (F 3240): p. 1-9.

23. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., and Saurel, R., *Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview.* Food Research International, **2007**. 40(9): p. 1107-1121.

24. Masters, K., *Spray drying. The unit operation today.* Industrial & Engineering Chemistry, **1968**. 60(10): p. 53-63.

25. Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M.E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M.N., and Dumoulin, E., *Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration.* Journal of Food Engineering, **2006**. 75(1): p. 27-35.

26. Christensen, K.L., Pedersen, G.P., and Kristensen, H.G., *Preparation of redispersible dry emulsions by spray drying.* International Journal of Pharmaceutics, **2001**. 212(2): p. 187-194.

27. Cui, J., Li, C., Deng, Y., Wang, Y., and Wang, W., *Freeze-drying of liposomes using tertiary butyl alcohol/water cosolvent systems.* International Journal of Pharmaceutics, **2006**. 312(1-2): p. 131-136.

28. Harrigan, P.R., Madden, T.D., and Cullis, P.R., *Protection of liposomes during dehydration or freezing.* Chemistry and Physics of Lipids, **1990**. 52(2): p. 139-149.

29. Steinberg, D.C., *Water activity.* Cosmetics & Toiletries. 122(No. 3): p. 103-106.

30. V.R.N, T. and T.G, K., *Viscoelasticity of Frozen/Thawed Egg Yolk as Affected by Salts, Sucrose and Glycerol.* Journal of Food Science, **1998**. 63(1): p. 20-24.

31. Matsuno, R. and Adachi, S., *Lipid encapsulation technology - techniques and applications to food.* Trends in Food Science & Technology, **1993**. 4(8): p. 256-261.

32. Boschkova, K., Elvesjö, J., and Kronberg, B., *Frictional properties of lyotropic liquid crystalline mesophases at surfaces.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2000**. 166(1-3): p. 67-77.

Chapitre 4

Approche Générique et Exploratoire en Lipotransformation Catalytique *in situ*

4.1 Introduction et démarche 163
4.2 Transformation *in situ* 166
4.2.1 Transformations chimiques des lipides 166
4.2.2 Morphologie de la graine 167
4.2.3 Lipases 168
4.3 Procédé Intégré avec hydrolyse *in situ* de graines de colza 171
4.3.1 Activités catalytiques de lipases testées par l'hydrolyse *in situ* 173
4.3.2 Séparation des fractions après transformation catalytique *in situ* des triglycérides endogènes de la graine de colza 176
4.3.3 Caractérisation des phases 177
4.3.4 Recyclage de la phase aqueuse 178
4.4 Méthode de séparation triphasique « three phase partitioning » 180
4.4.1 L'Etat de l'art 180
4.4.2 Démarche 181
4.4.3 Extraction des lipides par la méthode de séparation triphasique 182
4.4.4 Estérification des acides gras avec la méthode de séparation triphasique 183
4.5 Etude de l'extrapolation de la méthode de transformation *in situ* de lipides endogènes à d'autres matrices oléoprotéagineuses 186
4.5.1 Modifications dans le protocole opératoire du procédé intégré 186
4.5.2 Réactions d'hydrolyse *in situ* pour les différentes graines oléoprotéagineuses et caractérisation des phases obtenues lors du procédé intégré avec différentes graines oléoprotéagineuses 189
4.5.3 Type d'émulsion en fonction de la matrice oléoprotéagineuse 198
4.6 Avantage des milieux émulsionnés dans la transformation catalytique 199
4.7 Conclusion 199
4.8 Références bibliographiques 201

CHAPITRE 4
Approche Générique et Exploratoire en Lipotransformation Catalytique *in situ*

Dans ce dernier chapitre, nous présentons les travaux relatifs à la mise en place d'une transformation catalytique des lipides. Tout d'abord, nous présentons l'hydrolyse des triglycérides issus des graines oléoprotéagineuses, comme une étape intermédiaire du procédé intégré, pour l'obtention d'émulsions riches en acides gras en tant qu'espèces lipidiques majoritaires. Dans un deuxième temps, nous détaillerons l'estérification de ces acides gras sous forme émulsionnée avec un alcool, par une méthode de séparation triphasique connue en anglais comme *Three Phase Partitioning*. Selon cette méthode la technique consiste à séparer les lipides majeurs et les protéines fonctionnelles à partir des milieux émulsionnés issus du procédé intégré.

4.1 Introduction et démarche

Pour la production des esters d'huiles végétales à partir de graines oléoprotéagineuses entières, l'industrie emploie des technologies qui impliquent toute une série d'opérations unitaires. Elles vont de la trituration des graines jusqu'à la transformation chimique des lipides, en passant par le raffinage de l'huile brute. Ces méthodes sont ainsi fortement consommatrices d'énergie et mettent en jeu de nombreux entrants. Ceci implique la génération de co-produits, comme des tourteaux de mauvaise qualité nutritionnelle, qui doivent être valorisés. De plus, ces démarches impliquent la perte des constituants lipidiques multifonctionnels mineurs de haute valeur ajoutée, comme les phospholipides, les tocophérols, ou encore les phytostérols.

Dans le cadre d'un développement qui respecte les principes de la chimie verte, des travaux de recherche consistent à développer des approches pour travailler directement avec les graines oléoprotéagineuses et de faire les modifications *in situ*. Des auteurs ont proposé la

suppression des étapes de trituration et d'extraction. Harrington et d'Arcy-Evans[1, 2] ont validé un protocole de transestérification acido-catalysée chez le tournesol. Özgül-Yücel et Türkay[3] ont fait une estérification acide chez le son. Haas *et coll.*[4] ont optimisé les conditions opératoires de la transestérification baso-catalysée *in situ* chez le soja. D'autres auteurs ont plutôt fait appel à des catalyseurs biologiques dans la transformation des lipides, avec le but d'adoucir les conditions opératoires du procédé avec des temps de réaction raisonnables. Ces catalyseurs biologiques sont des lipases qui activent des réactions d'hydrolyse des triglycérides ou d'estérification des acides gras libres. Les sources de lipases sont très variées. Nous les trouvons dans les microorganismes, les animaux ainsi que chez les plantes.

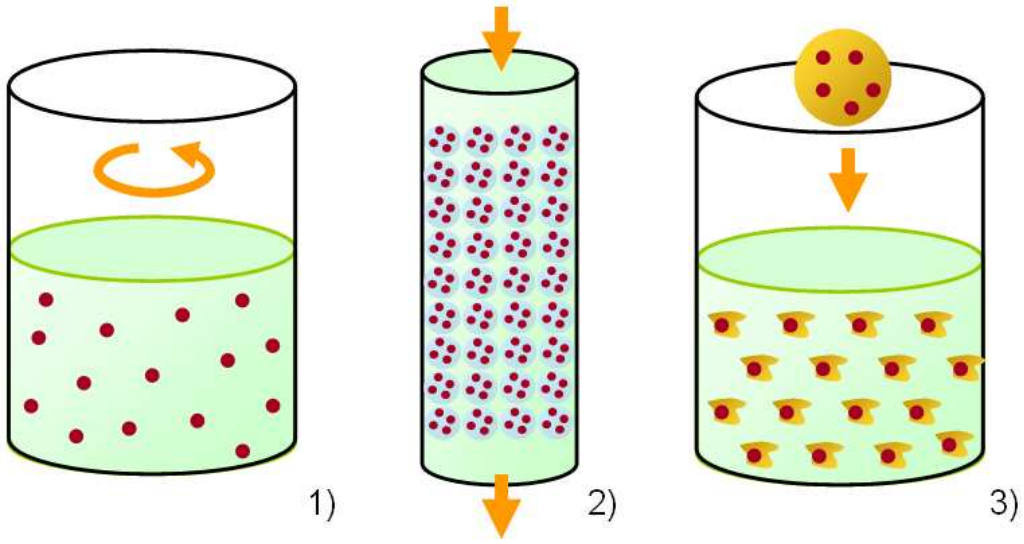


Figure 1 : Schéma des systèmes d'organisation de lipases : 1) lipase libre, 2) lipase fixée et 3) lipase contenue dans la matrice biologique

Pour l'emploi des lipases dans la transformation des lipides, trois approches expérimentales sont présentées en exemple (Figure 1). La première consiste à mettre la lipase directement en suspension dans le milieu réactionnel (lipase libre). Une autre méthodologie implique la fixation de la lipase sur un support hétérogène inerte de façon à la réutiliser (lipase immobilisée). Pereira *et coll.*[5] ont fait justement une comparaison de ces deux systèmes pour la lipase de *Candida rugosa*. Une alternative de rupture propose d'utiliser directement le matériel biologique qui les contient dans le procédé de façon à limiter les étapes de purification. C'est le cas de Kavitha *et coll.*[6], qui ont utilisé directement des microorganismes, provenant de sédiments marins, pour l'hydrolyse de triglycérides et la polymérisation des acides gras obtenus. Jachmanian *et coll.*[7] ont montré le pouvoir catalytique des lipases à l'intérieur des graines de colza en effectuant des hydrolyses des différentes

huiles végétales avec les lipases encore contenues dans ces graines.

Il existe d'autres travaux dans lesquels les lipides sont hydrolysés au sein même de graines de ricin[8], de nigelle[9] et de colza[10], porteuses des enzymes nécessaires. Dans ces exemples les temps de réaction sont parfois considérables du fait de la faible teneur ou de la faible activité des lipases. C'est ainsi qu'Alibert et Mouloungui[11] ont imaginé la création de graines oléoprotéagineuses génétiquement modifiées capables d'exprimer la lipase de G*eotrichum candidum* de façon à ce que l'hydrolyse de l'huile de ces graines ait lieu directement au cours des étapes de broyage qui mettent en contact l'enzyme et le substrat.

Cependant, les technologies impliquant des organismes génétiquement modifiés sont mal perçues par une grande partie de la population en raison des possibles risques qu'ils peuvent apporter à la santé humaine. C'est ainsi que Mechling et Mouloungui[12, 13], ont développé un procédé qui exploite la réactivité *in situ* des lipides endogènes des graines de colza en présence de la lipase de *Candida rugosa* ajoutée à basse température dans un milieu aqueux organisé. C'est une approche intégrée de libération des triglycérides endogènes en acides gras libres en milieu émulsionné. Cela implique une étape de transformation enzymatique qui est responsable de l'hydrolyse des triglycérides en acides gras. De plus, à la différence de tous les travaux qui ont été évoqués, ce concept implique la séparation des produits après transformation. La Figure 2 illustre les différentes étapes qui constituent ce procédé.

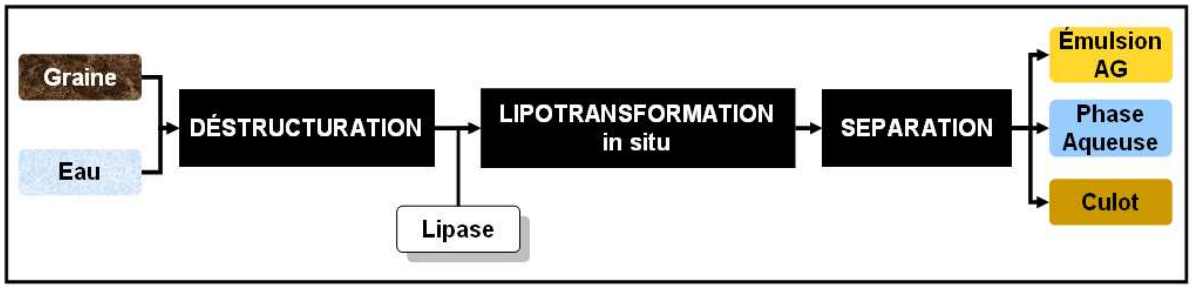


Figure 2 : Schéma du procédé intégré avec libération des lipides sous forme d'émulsion d'acides gras

Dans cette partie de nos travaux, nous proposons d'exploiter ce procédé en mettant en œuvre différentes graines oléoprotéagineuses pour l'obtention des milieux organisés contenant des acides gras. Le fait d'obtenir à la fois une fraction émulsionnée contenant les acides gras et une lipase incorporée préfigure des transformations ultérieures *post-planta*.

L'originalité de cette démarche réside dans la conservation du pouvoir catalytique de la lipase immergée dans le système organisé. Ce système est une émulsion à multiconstituants. Il est principalement constitué par les phospholipides, protéines membranaires et acides gras en présence de la lipase de *Candida rugosa* dans un milieu aqueux.

La démarche d'ingénierie inverse (voir Chapitre 2) nous a montré le rôle déterminant des phospholipides et protéines membranaires dans la structuration des interfaces d'émulsion directes où l'huile est constituée par des triglycérides. Dans cette démarche générique, ces biotensioactifs natifs vont continuer à structurer les interfaces des émulsions complexes, où les lipides seront composés principalement d'acides gras et de triglycérides, et permettre à la lipase de *Candida rugosa* d'évoluer localement aux interfaces.

L'objectif est de réaliser, *in situ* et en présence de cette enzyme, dans un premier temps, la rupture chimio-enzymatique des liaisons esters complexes des triglycérides et, dans un deuxième temps, la formation de liaisons esters simples entre les acides gras organisés sous forme d'émulsion et divers alcools. Ce concept impliquera des modifications dans l'organisation des lipides dans le système. Nous partons de lipides emprisonnés dans une matrice végétale, la graine, qui vont ensuite être libérés dans des milieux émulsionnés et transformés pour l'obtention d'acides gras et de leurs esters. Une étude de séparation de ces nouveaux milieux organiques sera menée, couplée à l'étude d'estérification de ces acides gras avec différents alcools, en gardant la même enzyme comme catalyseur.

4.2 Transformation in situ

Tout au long de ces travaux, nous nous sommes attachés à proposer des technologies simples qui englobent différentes actions à la fois, de façon à réduire le nombre d'étapes d'un procédé pour le développement de méthodes de transformations *in situ*.

4.2.1 Transformations chimiques des lipides

Parmi les transformations auxquelles peuvent être soumis les constituants de la graine, notre intérêt particulier à celles qui peuvent être réalisées sur les lipides, grâce aux réactions chimiques. Nous nous intéressons particulièrement aux suivantes :

- Hydrolyse de triglycérides : cette transformation correspond à la rupture des trois liaisons carboxyesters qui existent entre les acides gras et la molécule de glycérol dans les triglycérides (Figure 3).

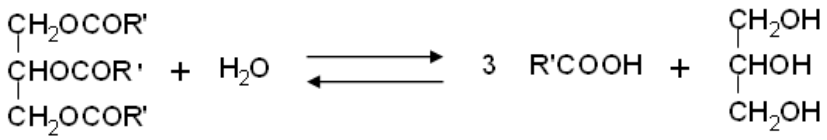


Figure 3 : Réaction d'hydrolyse de triglycérides

- Estérification d'acides gras libres : cette transformation peut être considérée comme la réaction inverse de l'hydrolyse, puisque il s'agit de la création d'une liaison carboxyester. Celle-ci est formée entre un acide gras et un alcool, pour donner ainsi un ester en milieu aqueux (Figure 4).

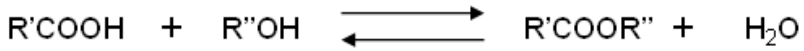


Figure 4 : Réaction d'estérification

Dans le cas des transformations *in situ* des milieux hétérogènes, la réactivité dépendra aussi de la mise en contact des réactifs. Dans le cadre de ces travaux de recherche ces milieux hétérogènes sont constitués d'une phase aqueuse, qui contient une phase organique dispersée et des solides suspendus issus des constituants de la graine. Le fait de travailler avec un milieu où le réactif est disposé sous forme d'émulsion représente un atout, car l'aire d'interface entre le substrat et l'enzyme, qui se trouve dans la phase aqueuse, est augmentée. Cependant ce système présente aussi des contraintes qui sont liées à la morphologie de la graine et à la réactivité que la lipase peut présenter pour un système aussi complexe que celui-ci.

4.2.2 Morphologie de la graine

Rappelons que les lipides sont présents dans les graines sous forme des petites structures appelées oléosomes. Ces structures globulaires sont distribuées à l'intérieur du tissu embryonnaire et le tout est protégé par la coque. Si nous voulons faire une transformation

catalytique de ces lipides à l'aide d'une lipase exogène, la complexité de la structure de la graine génère une contrainte sur la réactivité *in situ*, du fait qu'il faut que la lipase traverse toutes ces parois cellulaires pour atteindre son substrat.

En effet, comme il a déjà été constaté dans le Chapitre 3, le broyage humide, inhérent à ce procédé et responsable de la déstructuration de la graine entière sous assistance mécanique et physique, permet la libération des triglycérides endogènes. De plus, ils sont libérés en conservant leur structure d'oléosomes et forment ainsi une émulsion. Ceci représente un grand avantage pour la catalyse enzymatique car cette organisation augmente l'interface et favorise l'action catalytique de la lipase.

Les substrats d'études sont des graines entières de colza, les amandes de tournesol haut oléique, des graines de lin d'hiver et de printemps et des fèves de soja qui ont été caractérisées dans le Chapitre 3. Ils représentent des matrices à géométrie, taille, densité et compositions chimiques variables. Nous allons distinguer les matrices riches en huile (colza et tournesol), riches en protéines (soja) et riches en polysaccharides (lin). Le lin a la particularité de contenir dans son profil lipidique des teneurs élevées en acides gras polyinsaturés. Ceux-ci présentent le risque d'engendrer des réactions d'oxydation et de polymérisation à partir des fractions lipidiques.

La variabilité des agroconstituants majeurs protéiques, lipidiques et saccharifères et la présence des lipides thermosensibles sont à la fois des opportunités à exploiter et des risques à relever avec le concept de lipotransformation *in situ*. Il est par conséquent essentiel de maîtriser la connaissance de la composition des systèmes réactionnels en cause à partir de chaque matrice végétale pour mieux appréhender les réactions successives de transformation d'hydrolyse et d'estérification.

4.2.3 Lipases

Les lipases sont des protéines qui possèdent une activité catalytique capable d'hydrolyser les liaisons ester. D'après la classification numérique des enzymes, elles adoptent l'EC 3.1.1.3[14], qui correspond aux triacylglycérol acylhydrolases. Ces macromolécules appartiennent à la famille des hydrolases (EC 3) qui réagissent au niveau des

liaisons ester (EC 3.1) du groupe carboxylique (EC 3.1.1) des triglycérides (EC 3.1.1.3). Elles présentent néanmoins, sous certaines conditions, un pouvoir catalytique pour des réactions de synthèse comme l'estérification, ou la transestérification[15-17] (Figure 5).

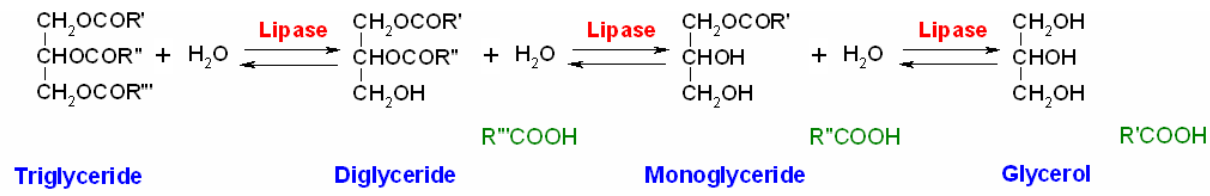


Figure 5 : Mécanisme d'action général des lipases dans la transformation de lipides. Les acides gras libérés sont représentés en vert

L'intérêt d'utiliser des lipases pour les transformations de lipides réside dans l'économie d'énergie où les conditions de pression et température sont modérées. De plus, les lipases sont des catalyseurs d'origine biologique et présentent souvent une haute sélectivité. Néanmoins il y a des travaux de recherche qui explorent l'emploi de lipases dans des conditions opératoires inhabituelles. C'est le cas de Weber *et coll.*[17], qui utilisent la lipase de *Candida rugosa* sous vide pour l'estérification et transestérification de différentes molécules lipidiques. A l'opposé nous avons Varma et Madras[18], qui utilisent des lipases immobilisées, en milieu supercritique, pour la synthèse des esters méthyliques à partir d'huile de ricin et de lin.

L'activité catalytique d'une lipase, comme pour n'importe quelle enzyme, est définie comme la vitesse initiale à laquelle elle synthétise le produit de la réaction. Ainsi, pour une lipase, cela correspond au nombre de moles d'acides gras générés dans une période de temps déterminée. Si celle-ci est divisée par la quantité de lipase introduite, nous parlerons d'une activité spécifique (AS) exprimé en µmol/min·g ou UL/g (Unité Lipase) :

$$AS = \frac{\Delta n_{AG}}{m_E \times \Delta t} \times 10^6$$

où :

Δn_{AG} représente la quantité de moles d'acides gras libérés dans un Δt

Δt est l'intervalle de temps dans lequel la vitesse de production du produit est constante

m_E correspond à la quantité d'enzyme utilisée

Dans notre cadre d'étude, nous avons choisi d'utiliser la lipase issue de *Candida rugosa*, qui a démontré une bonne activité catalytique dans de précédents travaux pour ce type de système[12]. Nous avons aussi testé la lipase issue de *Yarrowia lipolytica* de façon à comparer sa performance dans notre système.

4.2.3.1 Lipase issue de Candida rugosa

La lipase issue de la levure *Candida rugosa*, fait partie des triacylglycérol acylhydrolases qui appartiennent à la famille des hydrolases et réagissent spécifiquement sur la liaison ester du groupe carboxyester[19]. Il a été montré que cette lipase présente une bonne activité catalytique[20]. De plus, sa structure tridimensionnelle adopte une conformation particulière qui la rend active en s'adsorbant aux interfaces huile/eau[21, 22]. Cette enzyme produite extra cellulairement par *Candida rugosa*, aussi connue comme *Candida cylindracea*, est largement employée comme catalyseur de diverses réactions (hydrolyse, estérification, transestérification, interestérification) en milieux aqueux ou organiques[23].

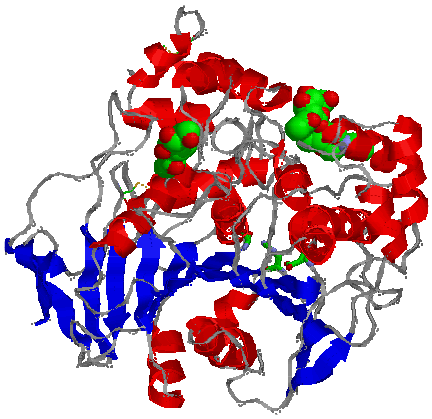


Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la lipase de *Candida rugosa* en rouge le hélices α et en bleu les feuilles β[24]

Cette enzyme (Figure 6) consiste en une seule chaîne polypeptidique de 543 acides aminés d'une taille moléculaire de 60 kDa[25], avec une triade catalytique bien définie Ser209-His449-Glu341. Cette triade est entourée principalement par des acides aminés avec un caractère hydrophobe et enfermée par un couvercle composé d'une hélice α amphiphile. L'activation interfaciale de cette enzyme est atteinte par l'ouverture de ce couvercle au-dessus de son site actif. Il a déjà été montré qu'une interface polaire/non polaire est nécessaire de façon à ouvrir ce couvercle et à permettre que le substrat soit en contact avec le site actif[26].

Ainsi, l'activité de cette lipase augmente avec la concentration d'eau jusqu'à un seuil[27].

Ainsi, travailler en milieu émulsifié constitue un avantage pour la réalisation de ce type de synthèse[28]. Nous avons utilisé l'enzyme commerciale Lipolyve CC. Il s'agit d'une préparation industrielle de la levure *Candida rugosa* sous forme lyophilisée.

4.2.3.2 Lipase issue de Yarrowia lipolytica

Comme nous l'avons dit précédemment, une autre lipase a été utilisée. Il s'agit de la lipase Lip 2 Yl. Cette lipase nous a été fournie en solution aqueuse. Elle a été produite par Alain Marty, du laboratoire de biotechnologie et bioprocédés de l'INSA de Toulouse. L'enzyme extracellulaire de la levure *Yarrowia lipolytica* est produite par fermentation[29].

L'unité lipase informe le type de substrat employé dans la détermination de l'activité catalytique. L'activité des deux lipases donnée par les fournisseurs (Tableau 1), n'est pas comparable si différents substrats sont employés. C'est grâce à l'activité rapportée pour la lipase Lipolyve CC en utilisant le paranitrophenol buryrate, que nous pouvons faire la comparaison entre les activités de ces deux enzymes.

Tableau 1 : Activités spécifiques pour chaque lipase rapportées par leur fournisseur

Lipase	Activité spécifique	Unité Lipase
Lipolyve CC	30 000 UL/g 3 140 UL/g	Trioléine Paranitrophenol buryrate
Lip2 Y.l.	120 UL/mL	Paranitrophenol buryrate

Il faut remarquer que ces activités spécifiques sont les activités que présentent les deux lipases dans ce système complexe. La première est exprimée par gramme d'enzyme lyophilisée et la deuxième par millilitre de milieu enzymatique proportionné.

4.3 Procédé Intégré avec hydrolyse in situ de graines de colza

L'hydrolyse est souvent sollicitée pour la mise en œuvre du concept de bioraffinerie. En effet, l'étude des interactions des lipides endogènes et enzymes fonctionnelles, *in planta*, en présence de la lipase de *Geotrichum candidum*[30] et, *ex planta*, en présence de la lipase de

Candida rugosa exogène[13], ont permis de provoquer l'hydrolyse des triglycérides endogènes et la libération de l'huile sous forme d'émulsion d'acides gras. Au cours de ces travaux, nous avons amélioré ce procédé établi par Mechling avec l'évolution technologique qui a été développée dans le Chapitre 3.

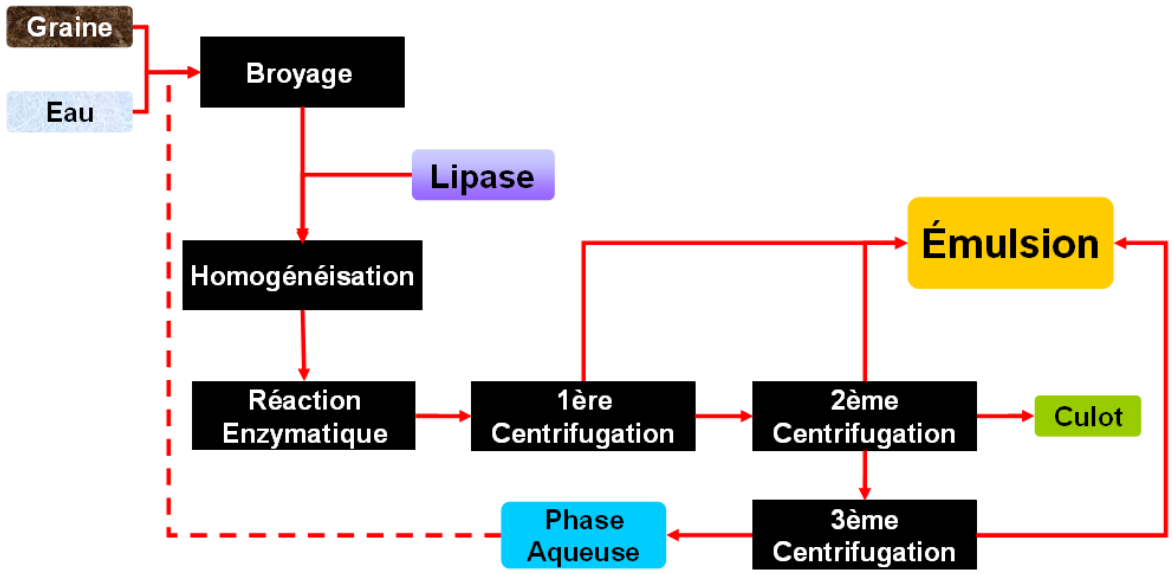


Figure 7 : Schéma des étapes du procédé intégré avec hydrolyse

La Figure 7 schématise les étapes du procédé intégré avec hydrolyse. Il est très similaire à celui présenté dans le Chapitre 3 car les graines sont ici aussi broyées en présence d'eau de façon à déstructurer les parois cellulaires et à réduire la taille des particules solides, favorisant ainsi la libération des corps lipidiques. Après ce broyage, une solution contenant la lipase est ajoutée avant l'étape d'homogénéisation à haute pression. Cela contribue à la déstructuration de la graine pendant qu'un contact plus intime entre la lipase et le substrat est créé. Le milieu hétérogène est ensuite introduit dans un réacteur muni d'un système d'agitation à température contrôlée constante pour donner lieu à la réaction d'hydrolyse enzymatique des triglycérides. Enfin, le milieu est séparé par deux cycles de centrifugation. Ce traitement mécanique permet de récupérer les différents produits en fonction de leurs densités.

De la même façon que pour le procédé intégré sans hydrolyse, trois phases sont obtenues avec la graine modèle : une émulsion, une phase aqueuse et un culot.

- **Emulsion :** C'est la phase la moins dense. Elle est constituée principalement des acides gras formés lors de l'hydrolyse. Bellemare a démontré que cette phase contient une fraction de la lipase de *Candida rugosa*[31]. La lipase est recyclable par adsorption sur support polymère Ambersep 900 Cl. Elle montre une activité sous cette forme immobilisée. La lipase de *Candida rugosa* montre ainsi des activités catalytiques vis-à-vis des réactions d'hydrolyse, d'estérification et de transestérification[32, 33].
- **Phase aqueuse :** C'est la phase intermédiaire. Elle contient la lipase qui n'a pas été adsorbée à l'interface eau/lipides, ainsi que toutes les molécules hydrosolubles de la graine : protéines hydrosolubles, sucres et minéraux. Le glycérol est préférentiellement localisé dans cette phase.
- **Culot :** C'est la fraction la plus dense. Elle est composée des débris cellulaires solides des graines constitués par des fibres et des protéines.

4.3.1 Activités catalytiques de lipases testées par l'hydrolyse in situ

Dans le but de comparer la performance catalytique des enzymes, nous avons réalisé la réaction d'hydrolyse *in situ* des triglycérides des graines de colza, en utilisant les deux lipases : la Lip 2 Yl et la Lipolyve CC.

P.1 Protocole d'hydrolyses

Un lot de 2 kg du milieu à traiter, avec une teneur massique des graines de colza de 20 % dans l'eau est broyé pendant 10 minutes à l'aide du mélangeur rotor / stator à puissance maximale. Parallèlement, les lipases, sous forme de poudre, sont dispersées dans 50 mL d'eau. La solution enzymatique est ensuite additionnée au broyat de graines précédemment obtenu. A ce stade, le milieu contient 19,5 % en masse de graines de colza et une concentration d'enzyme de 300 UL/g de graines a été choisie pour tous les essais[12]. Cette UL correspond à l'activité déterminée en employant la trioléine comme substrat. Le mélange subit alors deux cycles d'homogénéisation à haute pression à 350 bars. Après cette étape, le milieu est transvasé dans un réacteur à double enveloppe de 2 L, maintenu à 37 °C à l'aide d'un bain thermostaté. On laisse alors le milieu évoluer sous agitation (400 tr/min) pendant 360 minutes d'hydrolyse. La durée est définie à partir de l'ajout de l'enzyme. Le suivi cinétique des réactions d'hydrolyse est réalisé par chromatographie en phase gazeuse sur

colonne.

P.2 Suivi cinétique

Le suivi de la réaction est assuré par une série de prélèvements réalisés à des temps prédéterminés. Lors de ceux-ci, 1 mL de milieu est transféré dans un tube contenant 333 µL d'acide chlorhydrique à 2 N et 5 mL de cyclohexane de façon à arrêter l'activité de la lipase. Après une agitation vigoureuse, suivie d'une centrifugation, 200 µL de la phase organique (supérieure) sont prélevés, puis dilués 4 fois. 20 µL de TMSH sont ajoutés à la dilution et le tout est chauffé à 103 °C pendant 5 minutes avant d'être injecté en chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse.

A la suite de ces analyses, le degré d'hydrolyse (DH) est calculé. Ce degré d'hydrolyse mesure la production d'acides gras lors de la réaction :

$$Degré\ d'hydrolyse = \frac{liaisons\ ester\ hydrolysées}{liaisons\ ester\ initialement\ présentes} * 100$$

$$DH = \frac{[AG]}{[AG] + [MG] + 2[DG] + 3[TG]} * 100$$

où :

[AG] est la concentration molaire en acides gras

[MG] est la concentration molaire en monoglycérides

[DG] est la concentration molaire en diglycérides

[TG] est la concentration molaire en triglycérides

La Figure 8 illustre l'évolution des réactions d'hydrolyse en présence des deux lipases. L'activité catalytique présentée par ces deux lipases est différente pour ce système. La lipase Lipolyve CC avec une activité spécifique de 13 000 µmol/min·g, est capable d'hydrolyser la totalité des triglycérides en 150 minutes, tandis que la lipase Lip 2 Yl a une activité spécifique de 376 µmol/min·mL qui permet un degré d'hydrolyse de 35 % à la fin de la réaction. Nous remarquons que la cinétique d'hydrolyse de triglycérides avec la lipase Lip 2 Yl, est très vite ralentie, ce qui ne permet pas de compléter l'hydrolyse malgré la vitesse initiale.

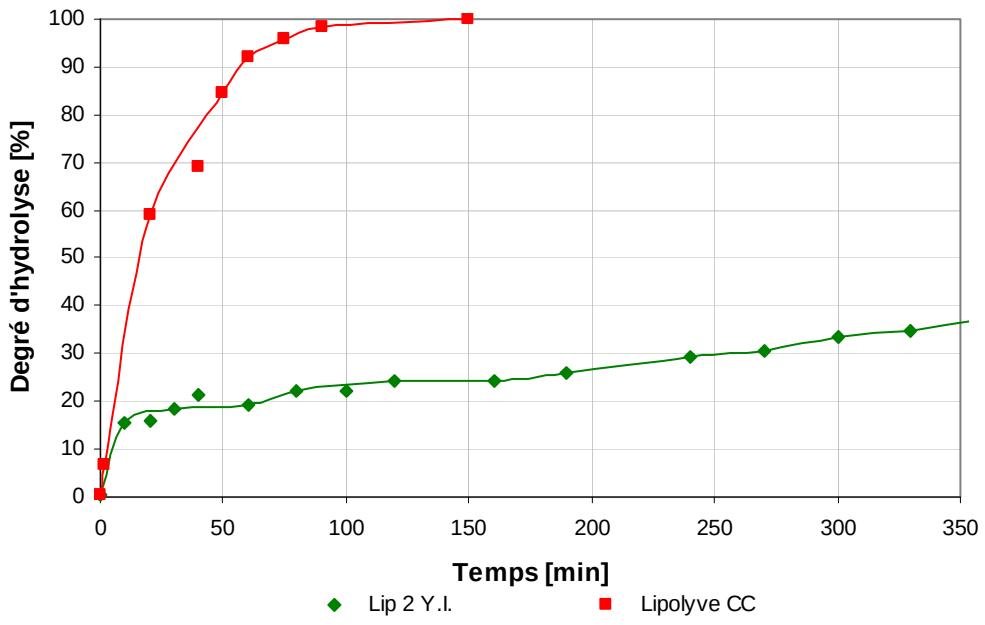


Figure 8 : Suivis cinétiques d'hydrolyse de triglycérides de colza par différentes lipases

Le fait que ces lipases soient actives peut s'expliquer par un positionnement à l'interface eau/lipides suivi d'une reconnaissance par le substrat. Les lipases exogènes doivent être insérées aux interfaces. Leur surface et leur configuration permettent de couvrir les films interfaciaux rigides créés par la présence des tensioactifs natifs que sont les phospholipides et les oléosines, auxquels s'ajoutent au cours de l'hydrolyse des acides gras, ainsi que des mono- et des diglycérides. L'émulsion formée présente des gouttelettes ayant une taille autour du micron. Cette taille est propice à la réactivité interfaciale aux interfaces huile/eau, où l'huile est représentée par les acides gras au détriment des triglycérides. Qui plus est, les acides gras, qui peuvent jouer le rôle de tensioactifs non ioniques et bactériostatiques, engendrent une stabilité chimique, physique et biologique de ces émulsions. Le glycérol semble jouer un rôle plastifiant des films rigides ou élastiques créés.

A la suite de ce screening, la lipase Lipolyve CC est retenue comme catalyseur dans la transformation de lipides pour la suite des travaux. L'évolution des glycérides lors de l'hydrolyse avec cette lipase, est présentée dans la Figure 9.

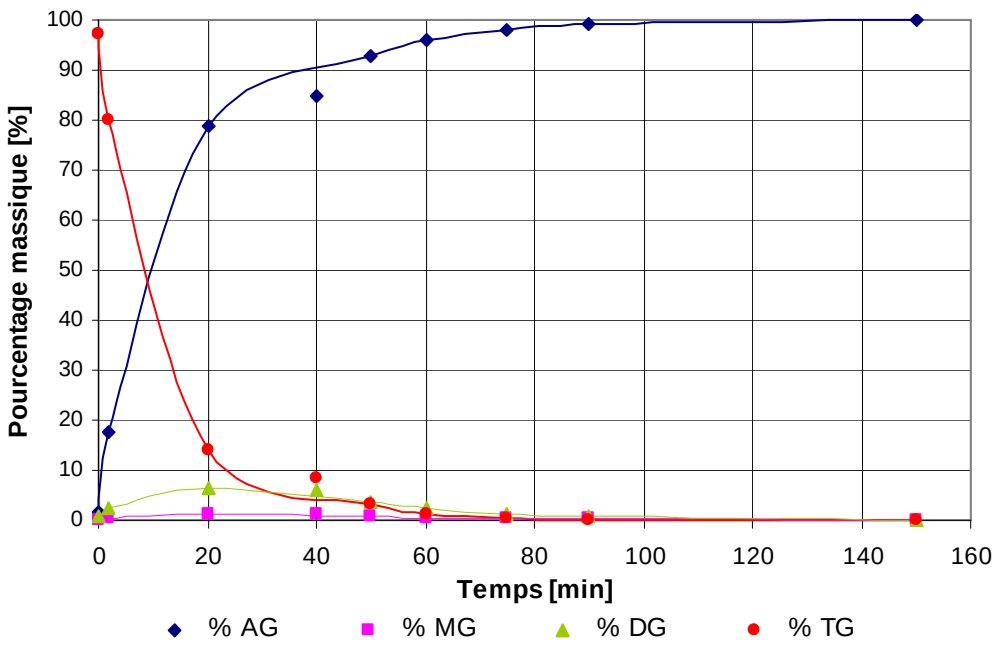


Figure 9 : Evolution de la composition massique des glycérides au cours de l'hydrolyse *in situ* des lipides de graines de colza

Nous remarquons qu'il suffit de 20 minutes pour que les acides gras représentent presque 80 % des glycérides. En même temps, nous observons l'apparition de mono- et diglycérides. Ce sont des produits intermédiaires, dont la teneur est de l'ordre de 2 et 7 % massique respectivement. A partir de 20 minutes, après la sortie de l'homogénéisateur, l'hydrolyse présente un ralentissement. L'hydrolyse est totalement achevée avant 120 minutes de réaction.

4.3.2 Séparation des fractions après transformation catalytique in situ des triglycérides endogènes de la graine de colza

Après hydrolyse, il est nécessaire de faire une séparation de phases par centrifugation. Le protocole correspond à celui déjà décrit dans le Chapitre 3.

P.3 Protocole

Après la phase d'incubation, la séparation des phases du milieu s'est faite à 5 000× g pendant 10 min et 6 °C, à l'aide d'une centrifugeuse équipée d'un rotor d'angle variable qui a une capacité de 4×400 mL. Ceci permet d'avoir une force centrifuge parallèle à l'axe vertical des tubes et ainsi d'obtenir au final une séparation bien horizontale des phases.

Après centrifugation, les différentes phases sont récupérées en versant délicatement l'émulsion et la phase aqueuse sur un filtre en nylon avec des mailles de 100 µm, de façon à retenir l'émulsion compacte et la séparer de la phase aqueuse qui traverse la toile. Une deuxième centrifugation a lieu après mélange manuel du culot avec la phase aqueuse. Enfin, une troisième centrifugation est réalisée sur la phase aqueuse récupérée après la deuxième centrifugation.

A la fin de la séparation de phases nous obtenons les trois phases attendues. Une phase émulsionnée qui représente 12 % en poids, une phase aqueuse qui est majoritaire avec presque 63 % en poids et un culot qui forme 25 % en poids de la totalité de la masse du milieu.

4.3.3 Caractérisation des phases

La composition chimique des différentes phases sont données dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Composition des différentes fractions obtenues après procédé intégré avec hydrolyse *in situ* en utilisant des graines de colza

Phase	Emulsion	Phase aqueuse	Culot
Proportion Massique (%)	12,3	62,8	24,9
pH	5,6	5,5	-
Conductivité (µS/cm)	0,5	861	-
Taille des gouttelettes (µm)	3,3	-	-
Taille des particules solides (µm)	-	-	450
% Eau	42,0	96,7	72,5
% Lipides	50,0	N.D.	4,2
% Protéines	6,7	1,3	4,7
% Phosphore	0,21	0,09	0,28
% Constituants pariétaux	-	-	8.5
% Minéraux	0,5	0,2	1,2
Acides gras libres (% par rapport aux lipides)	100	N.D.	N.D.

N.D. Non Déterminé

Les trois fractions obtenues, ont des teneurs de constituants différentes. Ainsi nous remarquons une émulsion constituée principalement d'acides gras et d'eau. Elle montre la

présence de protéines et de phosphore. La phase aqueuse se distingue par une conductivité apportée par la présence des composés hydrosolubles ionisés. Le culot est riche en constituants pariétaux (cellulose, hémicellulose et lignine), protéines et lipides.

L'observation microscopique de la phase émulsionnée montre qu'une émulsion complexe est formée (Figure 10). Celle-ci se caractérise par la présence de gouttelettes à l'intérieur d'autres gouttelettes d'une taille plus élevée et par une phase continue présentant des discontinuités. Ceci est confirmé par sa valeur de conductivité (0,5 µS/cm) proche de zéro. Le changement dans le type d'émulsion peut être expliqué par la transformation des lipides lors du procédé intégré. Un système auparavant stabilisé principalement par des protéines et des phospholipides, est par la suite modifié par la présence de mono- et diglycérides, autres tensioactifs bien connus qui apparaissent comme produits intermédiaires au milieu de l'hydrolyse (Figure 9).

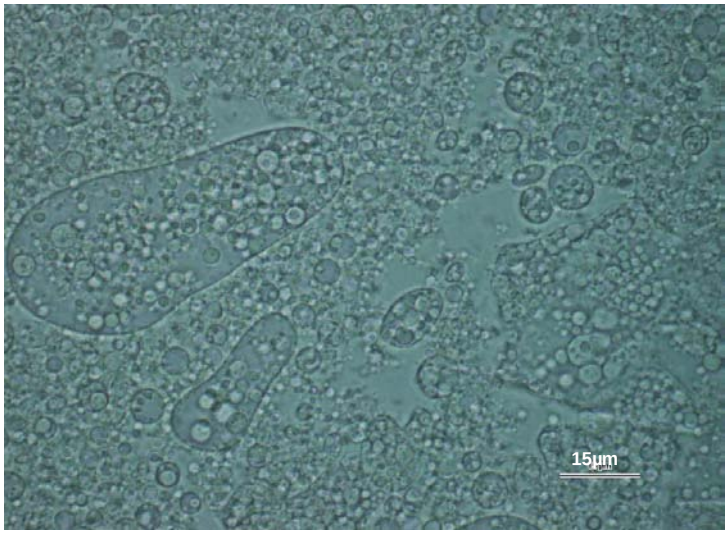


Figure 10 : Observation microscopique x 1 000 (objectif à immersion dans l'huile) de l'émulsion concentrée du procédé intégré avec hydrolyse *in situ* réalisé avec du colza. L'échelle représente 15 µm

4.3.4 Recyclage de la phase aqueuse

Le procédé intégré consomme une quantité non négligeable d'eau. Il est opportun de recycler l'eau à une étape du procédé : Nous avons retenu de traiter ce verrou en parallèle avec la question de recyclage de la lipase dans la phase aqueuse médiane. Rappelons que les travaux antérieurs ont montré la possibilité de recycler la lipase de *Candida rugosa* localisée dans l'émulsion complexe de la phase supérieure. Sa capacité catalytique a été maintenue

voire améliorée sur support Ambersep 900 Cl ou sur membrane au point qu'a été développé un concept de microréacteur propice à l'hydrolyse, estérification et transestérification à partir de la matrice lipidique de graines de colza broyées.

Ici, l'ambition affichée est de contribuer à l'amélioration technologique de la dernière étape du procédé, par couplage des outils de broyage aqueux et de séparation centrifuge : Il est attendu une récupération maximale de l'émulsion et le recyclage de l'eau riche en lipase de *Candida rugosa* de la phase médiane (Figure 7).

A ce stade des travaux, la localisation de la lipase de *Candida rugosa* repose sur l'hypothèse que l'enzyme présente une bonne solubilité dans l'eau, ce qui permettrait de la retrouver dans les fractions aqueuses des trois phases récupérées. Le plus simple semble de récupérer la lipase dans la phase aqueuse (celle du milieu), de façon à utiliser ce liquide pour le broyage de nouvelles graines. Ceci explique la troisième centrifugation (Figure 7) qui permet de récupérer un liquide contenant l'enzyme libre de lipides. Nous avons donc réalisé plusieurs cycles de réaction d'hydrolyse à partir des broyats de graine de colza (modèle d'étude) en recyclant la phase aqueuse contenant l'enzyme.

P.4 Protocole

La phase aqueuse médiane récupérée après le premier cycle d'essai sert de flux aqueux intrant pour le broyage des graines dans un deuxième cycle d'essai. Le recyclage est répété une autre fois. A partir du deuxième cycle d'essai, il n'y a plus d'ajout d'enzyme « fraîche », de façon à évaluer effectivement l'activité de l'enzyme résiduelle. Des suivis cinétiques sont réalisés au cours de chaque cycle d'essai.

La Figure 11 nous montre l'évolution des cinétiques d'hydrolyse obtenues en fonction des cycles d'hydrolyse. L'activité de l'enzyme diminue au cours des cycles. Elle passe d'une activité spécifique de 13 000 µmol/min·g dans le premier cycle d'essai à 1 900 µmol/min·g dans le deuxième cycle d'essai et 750 µmol/min·g pour le troisième cycle. Ces diminutions peuvent être associées à des pertes d'enzyme ou à une désactivation de l'enzyme. Malgré les pertes en activité spécifique, nous constatons que l'enzyme conserve un pouvoir catalytique encore satisfaisant qui permet d'arriver à un degré d'hydrolyse autour de 85 % après 240 minutes d'hydrolyse dans le deuxième cycle d'essai. Ainsi, nous pouvons envisager de

faire des hydrolyses plus longues avec des phases aqueuses recyclées. Il est ainsi possible de réaliser des ajouts d'enzyme « fraîche » en quantité strictement nécessaire de façon à retrouver la même activité spécifique.

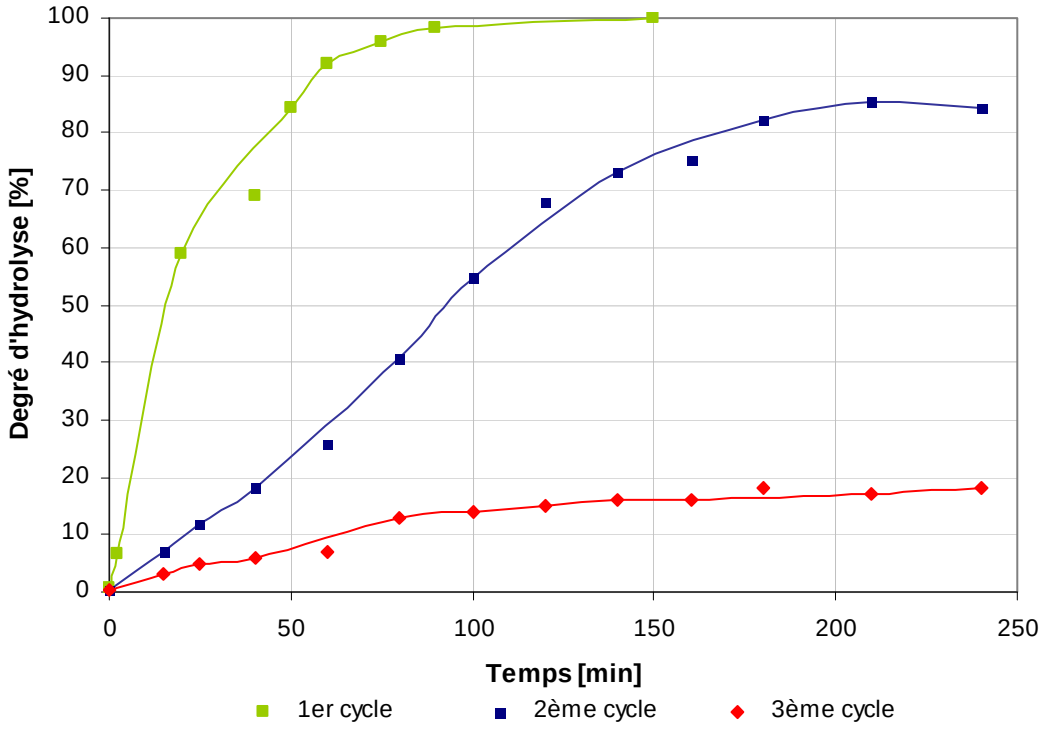


Figure 11 : Suivis cinétiques de l'hydrolyse des triglycérides endogènes de colza en recyclant la lipase de *Candida rugosa* une et deux fois

Le résultat majeur obtenu ici est la recyclabilité de la phase aqueuse et de la lipase, ainsi qu'un bon rendement d'hydrolyse. Le procédé peut fonctionner en circuit fermé de façon autonome avec des flux intrants d'eau et de lipase quasi constants.

4.4 Méthode de séparation triphasique « three phase partitioning »

4.4.1 L'Etat de l'art

La séparation triphasique (Three Phase Partitioning en anglais) est une technique conçue initialement pour la purification des protéines[34]. Cette méthode sert à concentrer les protéines en milieu aqueux, tout en conservant leur activité biologique[35].

Sharma *et coll.* ont démontré que cette technique peut aussi être appliquée à l'extraction d'huiles végétales à partir de la matière végétale[36]. Ceci, avec l'objectif de trouver de possibles substituants du n-hexane qui est le solvant le plus utilisé dans cette opération malgré sa forte toxicité et le danger qu'il représente pour l'environnement. Dans cette démarche, des améliorations ont été proposées en modifiant les conditions opératoires ou en ajoutant des enzymes, de façon à augmenter le rendement d'extraction[37, 38].

La méthode consiste à ajouter un solvant organique et un sel à une suspension aqueuse contenant des protéines. Le solvant le plus utilisé est le tert-butanol de par sa faible réactivité. En ce qui concerne le sel, le sulfate d'ammonium parait être le plus performant. Après une période d'incubation, l'ensemble est centrifugé pour obtenir trois phases bien définies. Il s'agit de deux phases liquides séparées par la fraction solide. La phase supérieure, contenant les substances organiques, est séparée de la phase aqueuse saturée en sel (phase inférieure), par une couche solide enrichie en protéines.

4.4.2 Démarche

Ce que nous proposons est de réaliser la séparation de composés hydrophiles, hydrophobes et protéines à partir des émulsions grâce à cette méthode. De cette façon, nous voudrions obtenir trois phases : la phase organique contenant les lipides, la phase aqueuse saturée du sel et enfin la phase solide constituée majoritairement des protéines avec une activité interfaciale.

P.5 <u>Protocole</u>

5 g d'émulsion provenant du procédé intégré avec hydrolyse in situ pour les graines de colza (basse en matière sèche) sont placés dans un tube à essai de 50 mL pour être dispersés dans l'eau (q.s.p. 20 mL). Ensuite, 30 % w/w de sulfate d'ammonium sont ajoutés et le tout agité vigoureusement (optionnel). Après, l'alcool à tester (1:1 v/v) est ajouté au mélange. Le tout subit une incubation à 37 °C pendant 16 heures. A la fin de la période d'incubation, le milieu est centrifugé pendant 10 minutes à 5 000× g à température ambiante pour obtenir ainsi trois fractions. Les alcools testés dans cette étude ont été le méthanol, l'éthanol, le 1-propanol, le butan-1-ol, l'isobutanol, le tert-butanol, le 1-octanol et le 2-éthyl-

1-hexanol. La phase supérieure, contenant les composants organiques, a été analysée par chromatographie de phase gazeuse.

4.4.3 Extraction des lipides par la méthode de séparation triphasique

En nous appuyant sur la méthode de séparation triphasique, les expériences ont été réalisées avec différents alcools, en s'inspirant du protocole de Gaur *et coll.*[38] En parallèle, nous effectuons des extractions en utilisant les mêmes alcools en absence de sulfate d'ammonium, ce qui nous permettra d'évaluer l'effet de ce dernier.

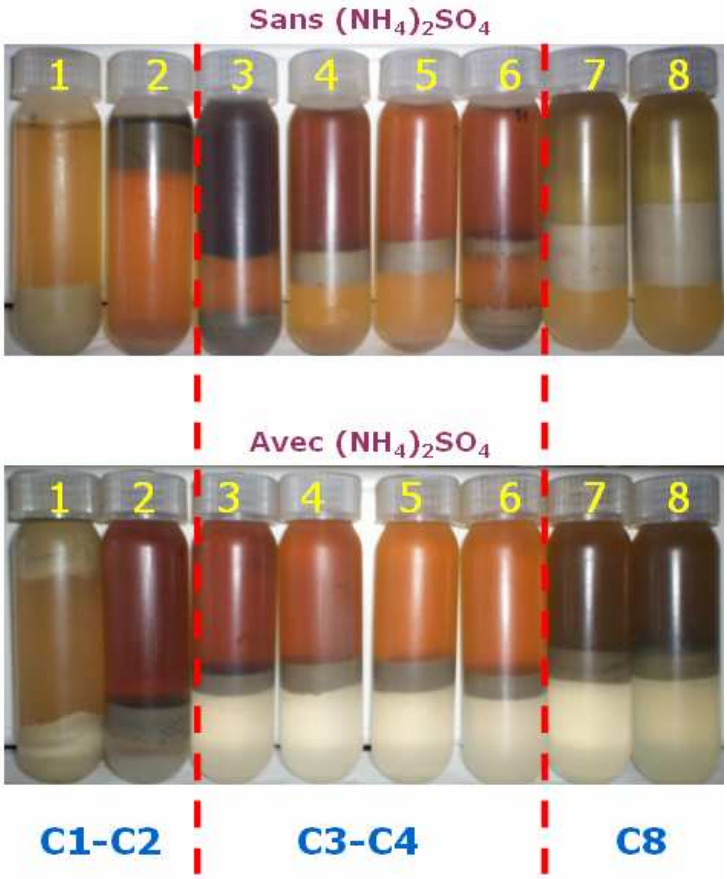


Figure 12 : Photographies des différents essais de la méthode de séparation triphasique sur une émulsion obtenue suite à un procédé intégré avec hydrolyse sur des graines de colza. **1.**Méthanol, **2.**Ethanol, **3.**1-propanol, **4.**Butan-1-ol, **5.**Iso-butanol, **6.**Tert-butanol, **7.**1-octanol et **8.**2-ethylhexan-1-ol

Figure 13 : Photographie montrant l'effet du sel dans la méthode de séparation triphasique avec le butan-1-ol sur une émulsion obtenue suite à un procédé intégré avec hydrolyse sur des graines de colza.

Les Figures 12 et 13 illustrent la séparation des phases après avoir appliqué la méthode de séparation triphasique sur l'émulsion d'acides gras. Pour les essais en présence du sel, l'apparition de deux phases liquides séparées par une couche solide est bien définie, à l'exception des essais qui ont impliqué l'éthanol et le méthanol, pour lesquels le sel n'apporte aucune amélioration. Sinon, nous remarquons que dans les cas où il y a eu une bonne séparation en présence du sel, la phase aqueuse est toujours incolore et présente un précipité de sel.

4.4.4 Estérification des acides gras avec la méthode de séparation triphasique

Nous avons trouvé un intérêt particulier à l'émulsion issue du procédé intégré avec hydrolyse car nous avons ainsi conçu la création d'un milieu réactionnel constitué d'acides gras en présence d'un alcool pour réaliser simultanément des estérifications. Le fait d'avoir encore de l'enzyme dans notre émulsion peut permettre de catalyser cette réaction.

L'avancement de la réaction d'estérification est déterminée par la mesure du degré d'estérification (DE) après analyses chromatographiques. Ainsi, le degré d'estérification, qui mesure la production d'esters lors de la réaction, est calculé :

$$Degré\ d'estérification = \frac{Liaisons\ ester\ \ formées}{Possibles\ liaisons\ ester} * 100$$

$$Degré\ d'estérification = \frac{[Ester]}{[Ester] + [AG]} * 100$$

où :

[AG] est la concentration molaire en acides gras

[Ester] est la concentration molaire en esters

Le Tableau 3 montre à la fois le rendement de lipides extraits et le degré d'estérification obtenus par la méthode de séparation triphasique en employant l'émulsion issue du procédé intégré avec hydrolyse. Nous pouvons souligner le pouvoir de tous les alcools, à l'exception du méthanol, à extraire les lipides de l'émulsion, avec des rendements supérieurs à 80 %.

Tableau 3 : Pourcentage massique des lipides extraits par différents alcools avec ou sans sulfate d'ammonium à partir d'une émulsion issue du procédé intégré avec hydrolyse des graines de colza

Alcool	% lipides extraits	% Degré d'estérification après 16 h d'incubation
Méthanol	-	-
Ethanol	80	0
1-propanol	85	4
Butan-1-ol	88	43
Iso-butanol	95	57
Tert-butanol	86	0
1-octanol	97	76
2-ethylhexan-1-ol	90	95

En ce qui concerne l'effet de la nature de l'alcool employé sur le degré d'estérification, il y a quelques points à souligner. En présence de méthanol et d'éthanol la réaction d'estérification est inopérante. Dans le cas du 1-propanol, elle existe mais dans un degré insignifiant. Si nous faisons une comparaison entre les alcools linéaires et ramifiés de quatre et huit atomes de carbone, nous constatons un degré plus important pour les alcools ramifiés (iso-butanol et 2-ethylhexan-1-ol) que pour les linéaires (butan-1-ol et 1-octanol) avec un même numéro d'atomes de carbone. Mais dans le cas du tert-butanol, qui est un alcool tertiaire, la réaction est absente. Ceci peut s'expliquer par un encombrement stérique du groupe hydroxyle qui empêcherait l'action de l'enzyme.

4.4.4.1 Cinétiques d'estérification

Après avoir évalué le pouvoir de la lipase issue de *Candida rugosa* résiduelle à estérifier les acides gras générés sous forme émulsionnée, nous avons considéré qu'il était judicieux de développer des suivis cinétiques de façon à juger s'il était nécessaire de laisser l'enzyme réagir plus longtemps pour augmenter les degrés d'estérification. Le protocole a été le même que celui décrit dans la Section P.5. Nous avons seulement modifié les temps de réaction.

La Figure 14 montre les suivis cinétiques d'estérification des acides gras. Nous ne constatons pas une différence pour les alcools à courte chaîne, le méthanol et l'éthanol, ni pour le tert-butanol. Même s'il existe une augmentation progressive dans le degré d'estérification pour le 1-propanol, celle-ci n'est pas significative en ne dépassant pas un degré de 5 %. Le graphique montre bien l'augmentation du degré d'estérification pour le butan-1-ol et l'iso-butanol. Il serait intéressant de faire des estérifications sur des durées plus longues et vérifier si ces réactions se poursuivent dans le cas des alcools à huit atomes de carbone. Cette augmentation est moins évidente à observer, ce qui nous fait penser que la réaction d'estérification est très rapide mais qu'elle arrive à un équilibre qui empêche d'estérifier la totalité des acides gras.

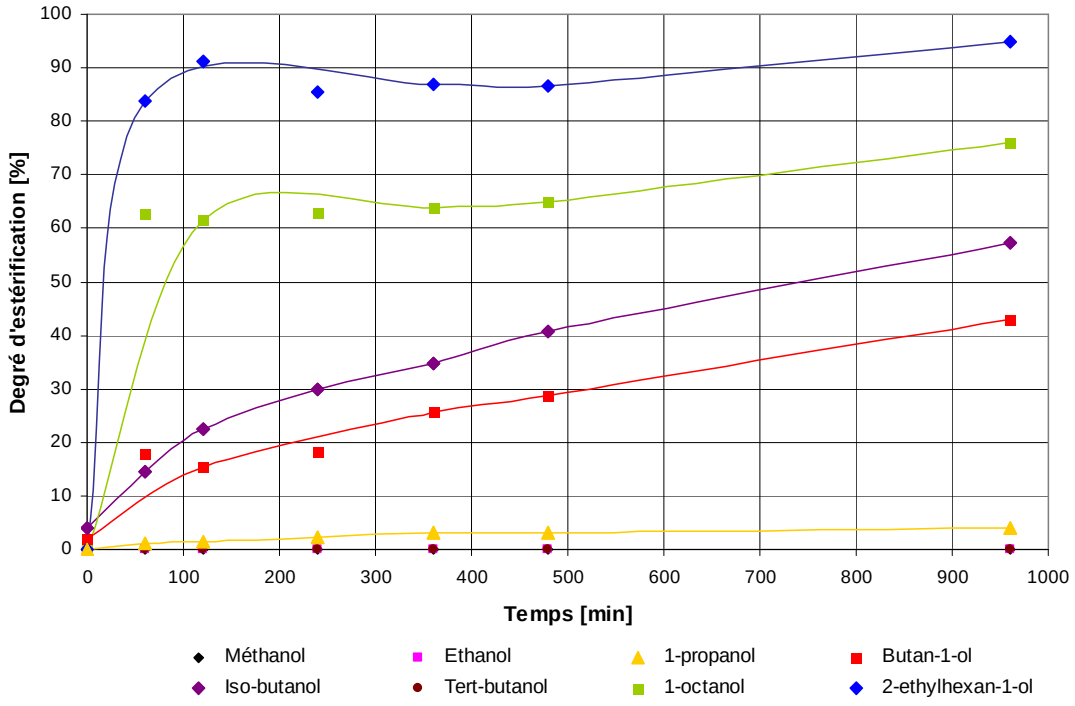


Figure 14 : Suivis cinétiques de l'estérification des acides gras de colza en utilisant différents alcools par la lipase issue de *Candida rugosa*

4.5 Etude de l'extrapolation de la méthode de transformation in situ de lipides endogènes à d'autres matrices oléoprotéagineuses

Il a déjà été démontré qu'il était possible de faire une hydrolyse *in situ* des graines de colza. Maintenant, la question qui se pose est de savoir s'il est possible de traiter d'autres graines oléoprotéagineuses avec ce procédé intégré incluant une hydrolyse *in situ*. C'est ainsi que des amandes de tournesol comme des graines de lin et de soja, déjà présentées au début du Chapitre 3, ont été choisies pour réaliser cette étude.

4.5.1 Modifications dans le protocole opératoire du procédé intégré

Dans le Chapitre 3, nous avons examiné de façon approfondie les morphologies de graines et les constituants de celles-ci. Il est apparu, dans le cas des graines de tournesol, des dimensions plus importantes que celles du colza, une densité faible, des coques et fibres en quantités significatives. Nos essais préliminaires de broyage aqueux de la graine entière de tournesol ont révélé la nécessité de procéder au décorticage préalable de cette graine pour récupérer l'amande et en faire la matière première de la filière de tournesol pour la libération *in situ* des lipides sous forme d'acides gras. Ainsi, pour la graine de tournesol, un décorticage est réalisé par une chaîne de décorticage/triage pilote de la compagnie CREOL. Ceci augmentera le rendement des lipides libérés par rapport à la masse de graines traitées et diminuera les problèmes techniques liés aux fibres qui apportent à la graine une résistance mécanique lors de sa déstructuration.

La graine de soja présente des dimensions pour lesquelles la grille à trous carrés, employée pour la graine de colza, n'exerce aucun effet. Un pré-broyage de 2 minutes avec le même outil mais avec la tête de désintégration polyvalente a ainsi été réalisé. En ce qui concerne les graines de lin, pour lesquelles la teneur en sucres représente 1/4 de la composition de la graine, une charge de 20 % amène une diminution de la performance du broyage par augmentation de la viscosité du milieu due au mucilage[39]. Ainsi une diminution dans la charge en graines est préconisée jusqu'à 10 %. Nous observons que cette diminution apporte au milieu un comportement rhéologique similaire à celui présenté par les autres

graines, en présentant des vitesses du rotor similaires après 10 minutes de broyage. Toutes ces modifications effectuées dans le protocole opératoire, en raison des différentes géométries et compositions présentées par les graines, sont synthétisées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Conditions opératoires lors du broyage humide en fonction de la graine utilisée. Le prétraitement est effectué avec la tête de désintégration polyvalente (B), pendant que le broyage se fait avec la grille à trous carrés à haut cisaillement (A)

Graine		**Colza**	**Amandes tournesol**	**Lin printemps**	**Lin hiver**	**Soja**
Décorticage		×	✓	×	×	×
Graines/Eau		20 %	20 %	10 %	10 %	20 %
Broyage	**Mélangeur rotor/stator**	A 10 min	A 10 min	A 10 min	A 10 min	B – 2 min A – 8 min
	HHP	2 cycles 350 bar	2 cycles 350 bar	2 cycles 350 bar	2 cycles 350 bar	2 cycles 350 bar
Vitesse du mélangeur à la fin du broyage		6 700 tr/min	5 700 tr/min	6 300 tr/min	6 300 tr/min	6 400 tr/min
Réacteur pour l'hydrolyse		4 h à 37 ºC 400 tr/min	4 h à 37 ºC 400 tr/min	4 h à 37 ºC 400 tr/min	4 h à 37 ºC 400 tr/min	4 h à 37 ºC 400 tr/min
Nombre de cycles de centrifugation		2	2	1	1	1

Après cette déstructuration des graines, nous ajoutons au broyat une solution homogène contenant l'enzyme Lipolyve CC à la même concentration que pour les travaux sur la graine de colza (300 UL/g de graine). Le tout subit ensuite deux passages à l'homogénéisateur haute pression à 350 bars. Ensuite, le milieu est transvasé dans un réacteur à double enveloppe de 2 L, maintenu à 37 °C à l'aide d'un bain thermostatique. On laisse alors le milieu sous agitation (400 tr/min) pendant 360 minutes d'hydrolyse à compter de l'instant d'ajout de l'enzyme. En fin de réaction, une séparation du milieu est réalisée pour récupérer les différentes phases. La séparation est réalisée dans une centrifugeuse équipée d'un rotor à angle variable à 5 000× g pendant 10 min et 6 °C.

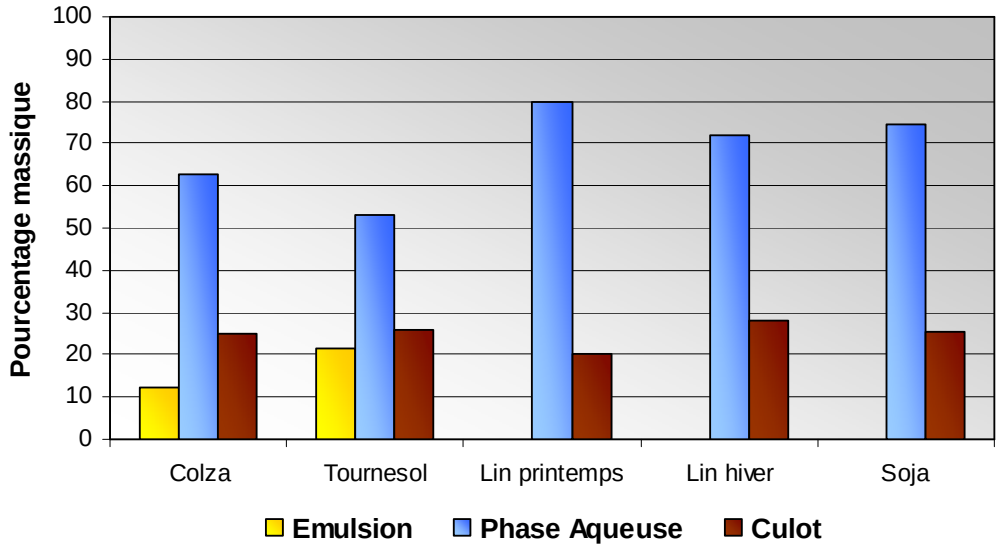


Figure 15 : Proportions des phases après centrifugation des milieux issus du procédé intégré avec hydrolyse pour différentes graines en pourcentage massique

Après centrifugation, les milieux se séparent différemment selon les caractéristiques des matrices. Sur la Figure 15, nous observons que le milieu issu des amandes de tournesol donne trois phases. Dans le cas du procédé mettant en jeu les matrices de graines de lin et de soja, seules deux phases distinctes sont obtenues : une phase solide et une phase liquide sans l'apparition d'une phase émulsionnée concentré et compacte à la surface. Rappelons que le soja est considéré ici comme une des matrices pauvres en huile (teneur inférieure à 20 %) et que le lin avec une charge d'à peine 10 % en graines contient en plus une forte teneur en polysaccharides. Ce qui explique la difficulté de faire émerger la fraction émulsionnée enrichie en acides gras après hydrolyse *in situ*.

Dans cet histogramme nous observons que pour les deux variétés de lin et le soja, les deux phases sont représentées comme phase aqueuse pour la phase liquide et culot pour la phase solide. La Figure 16 aide à faire une représentation des différentes phases obtenues après séparation centrifuge. Une fraction solide homogène apparaît pour les graines de tournesol, lin et soja, tandis que pour la graine de colza celle-ci est constituée de deux couches bien distinctes. De même, nous pouvons observer une émulsion concentrée à la surface et une phase aqueuse transparente pour le colza et le tournesol tandis que pour les deux variétés de lin et le soja une seule fraction liquide est présente.

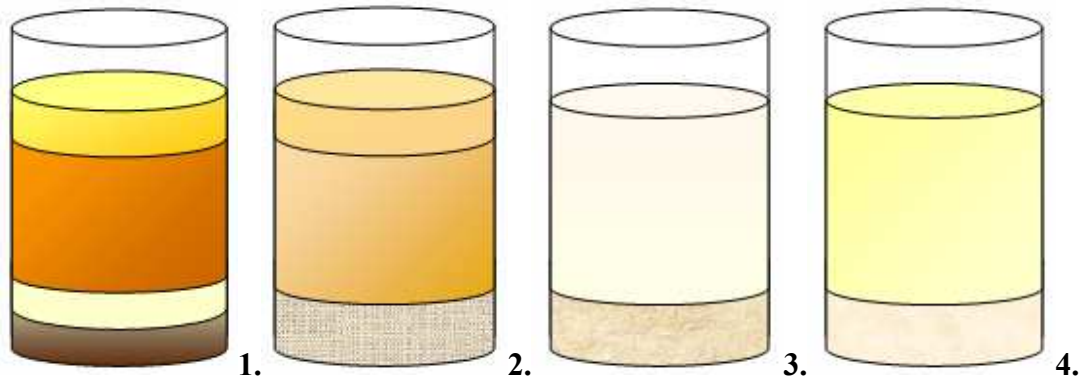


Figure 16 : Représentation de la séparation des différents broyats après centrifugation : **1.** Colza, **2.** Tournesol décortiqué, **3.** Lin **4.** Soja

4.5.2 Réactions d'hydrolyse in situ pour les différentes graines oléoprotéagineuses et caractérisation des phases obtenues lors du procédé intégré avec différentes graines oléoprotéagineuses

L'évolution de ces transformations catalytiques des lipides a été suivie en faisant des prélèvements du milieu au cours du temps à partir de l'ajout de l'enzyme Lipolyve CC. La caractérisation des différentes phases obtenues à la fin du procédé sont présentées par la suite pour chaque graine employée : l'évolution du profil des glycérides, la composition des différentes phases obtenues, ainsi que la caractérisation de l'émulsion en microscopie optique.

4.5.2.1 Graine de Tournesol

La Figure 17 illustre l'évolution de chaque espèce de glycéride au cours de l´hydrolyse *in situ* pour l'amande de tournesol. Nous constatons qu'au temps zéro, 96 % des glycérides sont des triglycérides. Leur disparition donne lieu à l'apparition d'acides gras. Tout au long de la réaction enzymatique, nous pouvons apprécier l'apparition de quelques traces de mono- et diglycérides, qui ne dépassent jamais 2 %. Après 190 minutes de réaction l'hydrolyse est totale grâce à une activité spécifique de la lipase de 2 300 µmol/min·g.

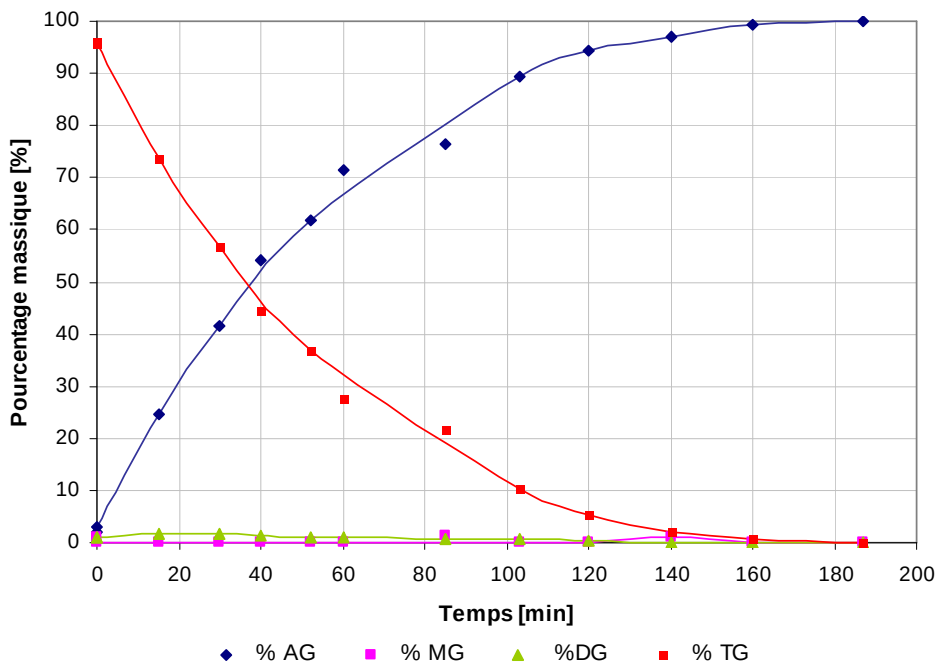


Figure 17 : Evolution de la composition massique des glycérides au cours de l'hydrolyse *in situ* de lipides endogènes de l'amande de tournesol

Le Tableau 5 rassemble les résultats d'analyses effectuées dans chacune des phases obtenues après l'hydrolyse *in situ*.

Tableau 5 : Composition en pourcentage massique des différentes fractions obtenues lors du procédé intégré avec hydrolyse effectué sur les amandes de tournesol

Phase	Emulsion	Phase aqueuse	Culot
Proportion Massique (%)	21,4	52,9	25,7
pH	4,5	4,9	-
Conductivité (µS/cm)	0,3	628	-
Taille des gouttelettes (µm)	2,5	-	-
% Eau	53,4	97,4	78,9
% Lipides	32,6	N.D.	9,9
% Protéines	14,5	0,9	5,2
% Phosphore	0,21	0,05	0,32
% Constituants pariétaux	-	-	7,5
% Minéraux	0,4	0,3	1,0
Acides gras libres (% par rapport aux lipides)	100	N.D.	N.D.

N.D. Non Déterminé

Nous remarquons que pour les amandes de tournesol, trois fractions sont obtenues. Une phase émulsionnée représentant 1/4 de la masse totale du milieu, une phase aqueuse qui comprend la moitié du milieu et un culot. Chaque phase a une composition particulière. L'émulsion a une teneur en eau supérieure à 50 %, une teneur plus importante en protéines par rapport à celle du colza (14,5 % à la place de 6,7 %) et contient un peu plus de 32 % de lipides (sous forme d'acides gras). L'émulsion est complexe. Cette constatation repose sur les observations microscopiques (Figure 18). En effet, nous observons des gouttelettes à l'intérieur d'autres gouttelettes de taille plus importante. Il est aussi possible d'observer la discontinuité de la phase continue, ce qui coïncide avec l'absence de conductance (0,3 µS/cm).

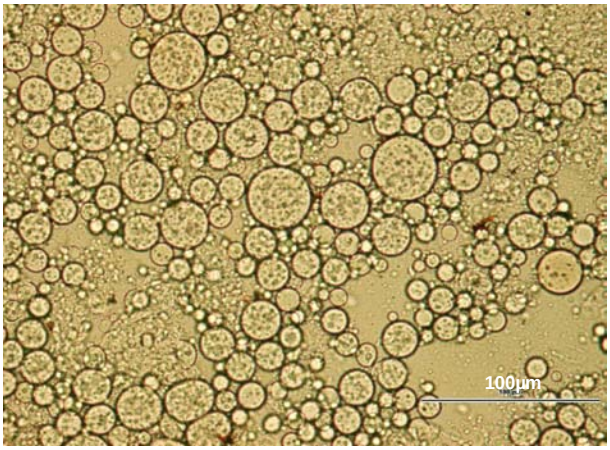


Figure 18 : Observation microscopique x 400 de l'émulsion concentrée du procédé intégré avec hydrolyse *in situ* réalisé avec l'amande de tournesol. L'échelle représente 100 µm

4.5.2.2 Graine de lin printemps

La Figure 19 montre l'évolution des glycérides lors de l'hydrolyse *in situ* réalisée sur les graines de lin printemps. L'activité spécifique de l'enzyme de *Candida rugosa* pour cette graine est de 2 750 µmol/min·g. Nous pouvons observer dans ce graphique que la transformation de triglycérides en acides gras s'accélère après quelques minutes de réaction. Ceci explique l'hydrolyse d'un peu plus de 80 % des triglycérides après 30 minutes de réaction. Cependant l'hydrolyse est totale après 160 minutes de réaction. Nous constatons aussi l'apparition de produits intermédiaires autour de 20 minutes de réaction, avec une concentration importante de diglycérides qui dépasse 7 %.

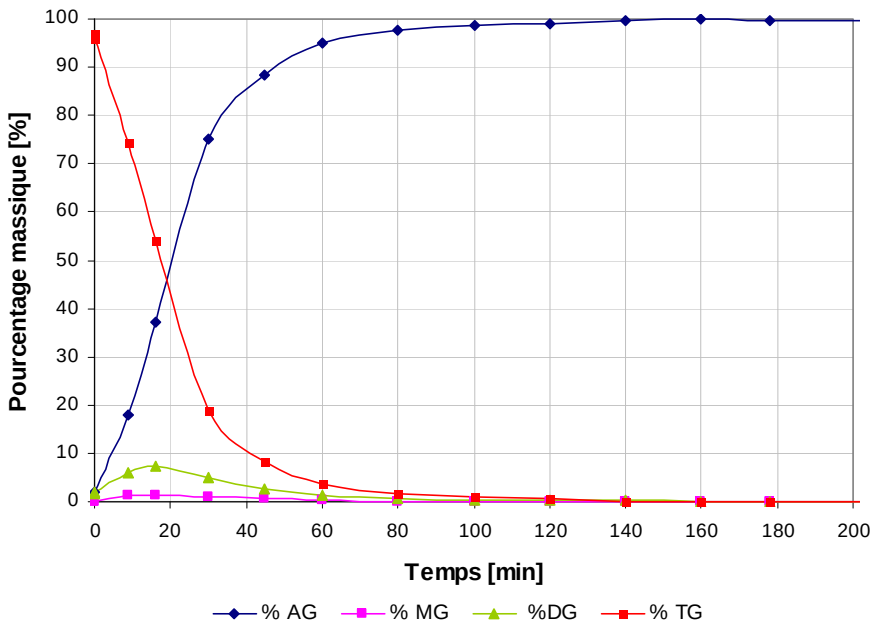


Figure 19 : Evolution de la composition massique des glycérides au cours de l'hydrolyse *in situ* de lipides endogènes de graines de lin printemps

Comme nous l'avons déjà précisé, cette graine produit deux phases après séparation centrifuge. A la différence des graines de colza et de tournesol, nous n'obtenons pas une phase émulsionnée concentrée. Cependant, la phase liquide contient les acides gras libérés sous forme des gouttelettes. Ceci est confirmé par les analyses de la composition de ces deux phases qui sont synthétisées dans le Tableau 6.

Pour les deux phases, la teneur en eau est très importante. Nous observons aussi que la teneur en lipides dans la phase liquide est faible. Ceci peut s'expliquer par la faible charge en graines du milieu (10 %) mais aussi par la présence de polysaccharides hydrosolubles (mucilage) qui épaississent le milieu, ce qui ralentit le crémage des oléosomes. Nous constatons, d'après ces résultats, que la phase solide contient encore beaucoup de lipides. La même augmentation dans la viscosité du milieu peut expliquer la difficulté à transporter les corps lipidiques vers l'extérieur de la matrice végétale. Cependant, ceci n'empêche pas la transformation de tous les triglycérides en acides gras.

Tableau 6 : Composition en pourcentage massique des différentes fractions obtenues lors du procédé intégré avec hydrolyse effectué sur la graine de lin printemps

Phase	Phase Liquide	Phase Solide
Proportion Massique (%)	79,82	20,18
pH	5,5	-
Conductivité (µS/cm)	443	-
Taille des gouttelettes (µm)	2	-
% Eau	92,7	80,2
% Lipides	1,9	3,4
% Protéines	1,1	6,9
% Phosphore	0,05	0,30
% Constituants pariétaux	-	3,9
% Minéraux	0,5	0,9
Acides gras libres (% par rapport aux lipides)	100	N.D.

N.D. Non Déterminé

La Figure 20 montre une image prise lors des observations microscopiques. Cette image trompeuse nous fait croire en l'existence de zones d'émulsion multiple. Néanmoins, d'après une observation minutieuse, nous avons constaté qu'il s'agit bien d'un effet optique provoqué par le regroupement de petites gouttelettes sur des gouttelettes de plus grande taille (probablement produites par coalescence). De plus, la mesure de conductivité (443 µS/cm) de cette phase corrobore bien une phase conductrice. Tout ceci veut dire qu'il s'agit bien d'une émulsion directe où la phase aqueuse ne perd pas sa continuité.

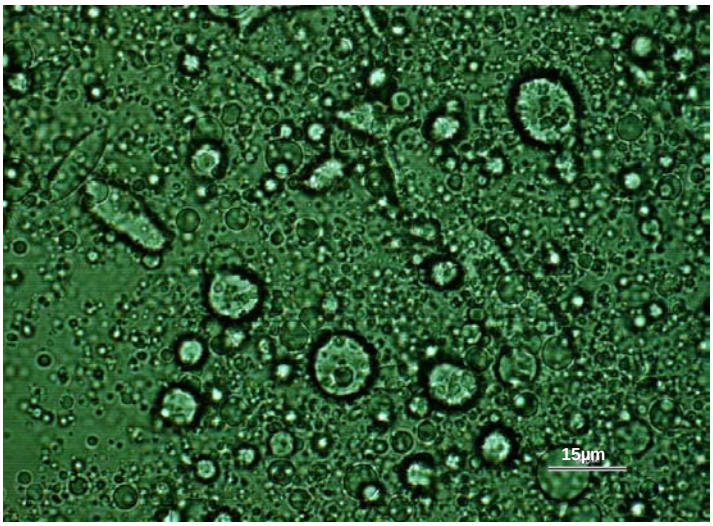


Figure 20 : Observation microscopique x 1 000 (objectif à immersion dans l'huile) de la phase liquide du procédé intégré avec hydrolyse *in situ* réalisé avec la graine de lin printemps. L'échelle représente 15 µm

4.5.2.3 Graine de lin hiver

Cette graine a un comportement très similaire à la graine de lin printemps. Une réaction d'hydrolyse avec une activité spécifique de 5 480 µmol/min·g permet d'hydrolyser la totalité des triglycérides en 80 minutes (Figure 21). En effet, à la différence d'autres graines, la réactivité ne présente pas de grands ralentissements si ce n'est à la fin. De la même façon que la graine de lin printemps, au début de la réaction nous trouvons des accumulations de produits intermédiaires, surtout de diglycérides dont la concentration augmente à 5 % avant 15 minutes.

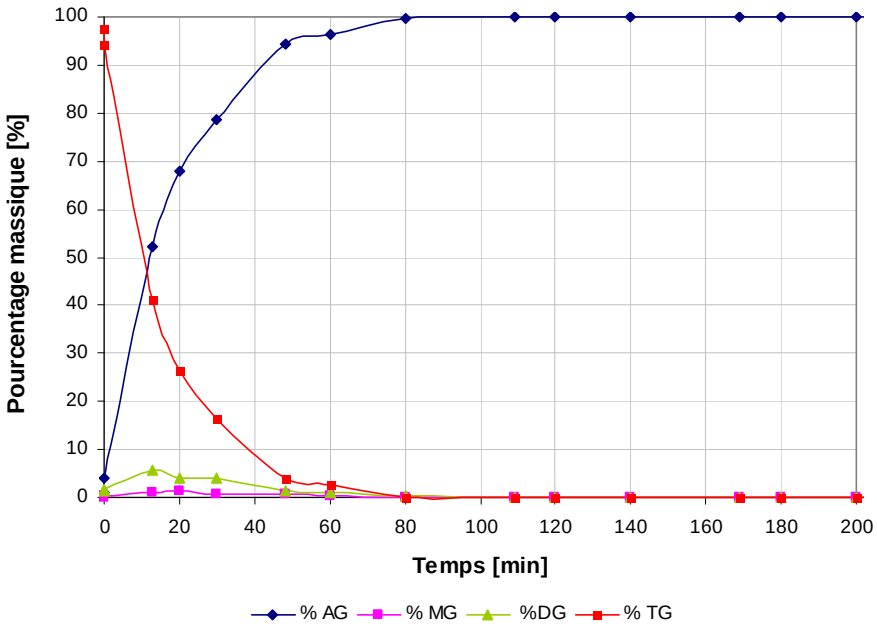


Figure 21 : Evolution de la composition massique des glycérides au cours de l'hydrolyse *in situ* de lipides endogènes de graines de lin hiver

En ce qui concerne les compositions des phases obtenues après la séparation du milieu, nous ne remarquons pas des grandes différences. Nous continuons à avoir une phase liquide qui contient les corps lipidiques sans pouvoir former une émulsion concentrée. De la même façon, nous constatons une teneur plus importante en lipides dans la phase solide.

Tableau 7 : Composition en pourcentage massique des différentes fractions obtenues lors du procédé intégré avec hydrolyse effectué sur de graines de lin hiver

Phase	Phase Liquide	Phase Solide
Proportion Massique (%)	71,93	28,07
pH	5,8	N.D.
Conductivité (µS/cm)	450	N.D.
Taille des gouttelettes (µm)	1.9	N.D.
% Eau	93,8	83,5
% Lipides	1,6	4,4
% Protéines	1,1	3,6
% Phosphore	0,04	0,15
% Constituants pariétaux	N.D.	3,4
% Minéraux	0,6	0,8
Acides gras libres (% par rapport aux lipides)	100	100

N.D. Non Déterminé

Nous sommes à nouveau en présence d'une émulsion directe malgré ce que peut nous faire penser l'image prise lors des observations microscopiques sur la phase liquide (Figure 22). Le regroupement de petites gouttelettes sur des gouttelettes de plus grande taille, ne génère pas une discontinuité de la phase aqueuse (validé par une mesure de conductivité (450 µS/cm)).

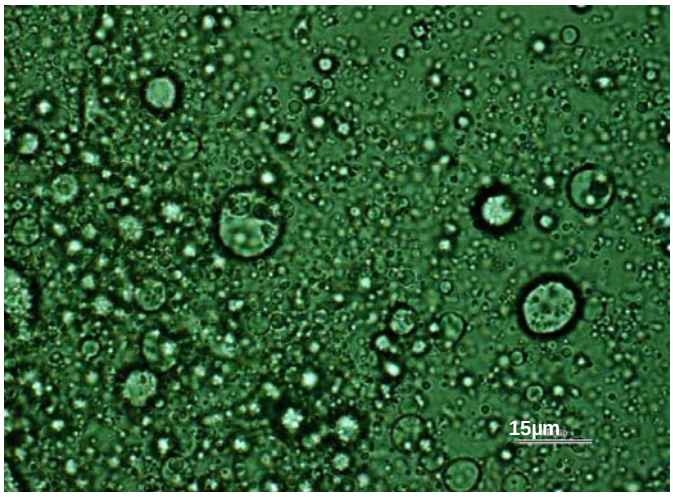


Figure 22 : Observation microscopique x 1 000 (objectif à immersion dans l'huile) de la phase liquide du procédé intégré avec hydrolyse *in situ* réalisé avec la graine de lin printemps. L'échelle représente 15 µm

4.5.2.4 Fèves de soja

La Figure 23 illustre l'évolution des glycérides au cours de la réaction d'hydrolyse effectuée sur les fèves de soja.

A la différence de toutes les autres matrices testées, celle-ci présente depuis le début de la réaction une teneur non négligeable en acides gras, 23 %. Après l'ajout de l'enzyme, la réaction d'hydrolyse démarre avec une activité spécifique de 2 040 µmol/min·g. Après 60 minutes d'hydrolyse, la réaction présente un fort ralentissement avec un plateau persistant jusqu'à la minute 160. Ainsi, après 240 minutes, la réaction n'est pas complète avec 2,5 % en masse de triglycérides. Nous remarquons aussi qu'à la différence d'autres espèces, les fèves de soja ne présentent que quelques traces de diglycérides (< 1 %) entre les minutes 120 et 140.

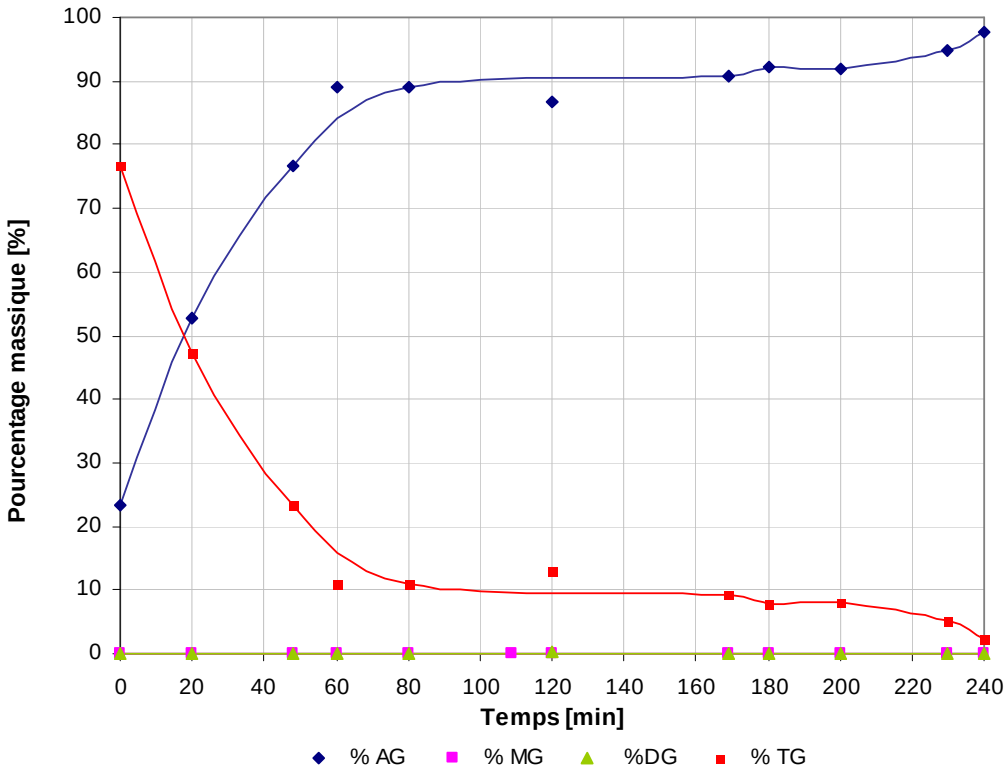


Figure 23 : Evolution de la composition massique des glycérides au cours de l'hydrolyse *in situ* de lipides endogènes de fèves de soja

Après centrifugation du milieu hydrolysé, la fève de soja présente le même comportement que les deux variétés de graine de lin. Le Tableau 8 illustre la composition de ces deux phases obtenues (liquide et solide). Nous pouvons observer que la phase solide

représente 25 % du milieu. En ce qui concerne sa composition nous remarquons des teneurs similaires de chaque constituant, avec la différence que la phase solide contient les constituants pariétaux.

En ce qui concerne le type d'émulsion formée après hydrolyse *in situ*, nous observons une émulsion directe grâce à l'observation microscopique réalisée sur la phase liquide (Figure 24). Celle-ci est constituée de gouttelettes bien dispersées dans une phase aqueuse continue (1168 µS/cm de conductivité).

Tableau 8 : Composition en pourcentage massique des différentes fractions obtenues lors du procédé intégré avec hydrolyse effectué sur de fèves de soja

Phase	Phase Liquide	Phase Solide
Proportion Massique (%)	74,6	25,4
pH	5,7	-
Conductivité (µS/cm)	1168	-
Taille des gouttelettes (µm)	1,5	-
% Eau	87,0	73,7
% Lipides	1,4	1,6
% Protéines	7,5	9,3
% Phosphore	0,15	0,14
% Constituants pariétaux	-	8,4
% Minéraux	0.9	1,1
Acides gras libres (% par rapport aux lipides)	97,6	N.D.

N.D. Non Déterminé

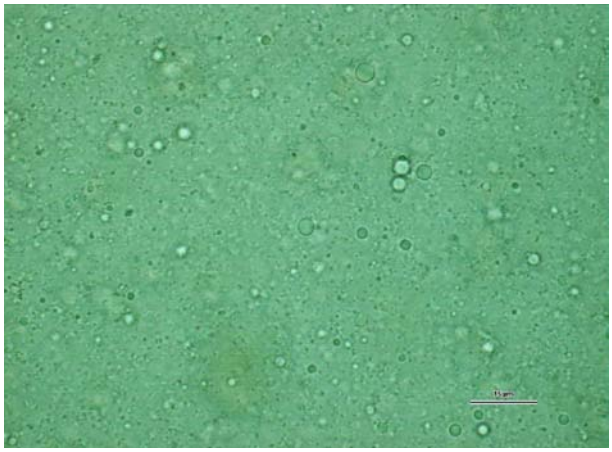


Figure 24 : Observation microscopique x 1 000 (objectif à immersion dans l'huile) de la phase liquide du procédé intégré avec hydrolyse *in situ* réalisé avec la fève de soja. L'échelle représente 15 µm

Cette émulsion s'est montrée performante pour ce type de systèmes jusqu'à la fin de la période d'incubation. Les profils obtenus des degrés d'hydrolyse des triglycérides endogènes pour les différentes matrices oléoprotéagineuse présentent des comportements différents. Pour les deux variétés de graines de lin, l'évolution de la réaction d'hydrolyse est similaire à celle observée à partir de la graine de colza. Au contraire, pour la graine de tournesol, nous constatons une hydrolyse complète mais plus lente que pour le reste des graines. Ceci pourrait venir d'une teneur plus importante en protéines qui empêcherait le positionnement de la lipase exogène à l'interface eau/lipides. Dans le cas du soja, nous constatons un comportement similaire, une présence plus importante des protéines pourrait également ralentir la cinétique d'hydrolyse. Pour cette dernière graine, l'hydrolyse n'arrive pas à sa fin après 240 minutes de réaction.

4.5.3 Type d'émulsion en fonction de la matrice oléoprotéagineuse

Nous pensons que le fait d'avoir des émulsions concentrées favorise la coalescence des gouttelettes en présence des nouveaux tensioactifs formés lors de l'hydrolyse enzymatique, c'est-à-dire, des di- et monoglycérides résiduels. Ces molécules sont observées lors de l'hydrolyse des graines de colza, de lin et des amandes de tournesol. Même si leur pourcentage massique parmi les glycérides n'est pas élevé, cette teneur peut être à l'origine de l'altération de l'interface huile/eau et provoquer la coalescence. Cette coalescence serait la responsable de l'apparition des diverses conformations dans une émulsion, donnant lieu à une émulsion complexe pour les graines de colza et les amandes de tournesol.

Dans le cas des deux variétés de lin, la grande quantité d'eau ralentit un peu plus les collisions entre gouttelettes en diminuant ainsi floculation et coalescence. C'est pour cela que nous observons pour ces matrices la coalescence de quelques gouttelettes, sans que cela provoque un changement drastique dans la conformation de l'émulsion.

4.6 Avantage des milieux émulsionnés dans la transformation catalytique

Comme nous l'avons observé au cours de ce chapitre, nous exploitons la réactivité des milieux émulsionnés. En effet, l'avantage de travailler avec ce type de milieu vient de la disponibilité d'une aire d'interface beaucoup plus importante. Celle-ci est fondamentale car notre catalyseur, indispensable aux transformations présentées au cours de ce chapitre, en a justement besoin pour être actif. La Figure 25 schématise ces interfaces eau/lipides.

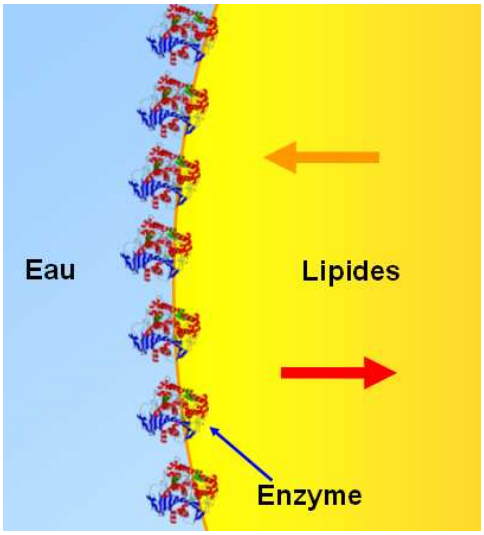


Figure 25 : Schéma illustrant le transfert des molécules à l'interface

Ainsi, la réaction dans nos milieux émulsionnés se déroule dans des « microréacteurs » représentés par les gouttelettes. Pour que tous les lipides réagissent dans chaque « microréacteur », un transfert de masse est nécessaire. Celui-ci est favorisé par les petites tailles des gouttelettes.

4.7 Conclusion

Tout au long de ce chapitre, nous avons analysé l'activité d'une lipase au sein d'un système complexe (*in situ*). Dans ce dernier, la lipase de *Candida rugosa* a fait preuve de performance comme catalyseur pour la transformation des triglycérides en comparaison à la lipase Lip 2 Yl. De plus, cette lipase a montré une versatilité d'action et une résistance aux différentes étapes du procédé.

Si les travaux antérieurs ont démontré la réactivité qu'apporte cette enzyme avec son activité catalytique pour l'hydrolyse de triglycérides, nous avons démontré ici qu'elle continue à avoir une activité, différente, lors de l'adaptation de la méthode de séparation triphasique. Dans ce cas il s'agit aussi d'un catalyseur pour la synthèse d'esters en présence de certains alcools. En plus, lors de cette étude, nous avons confirmé la possibilité de recycler la lipase *Candida rugosa* à partir de la phase aqueuse.

Nous sommes capables d'obtenir différents produits à partir de la graine entière grâce aux différents procédés qui font appel à des transformations physiques et chimiques. La formation des émulsions contenant les acides gras est possible en employant le procédé intégré sur les différentes graines oléoprotéagineuses. Pour la graine de colza, l'obtention des milieux organiques contenant des esters est mise en œuvre par la méthode de séparation triphasique.

4.8 Références bibliographiques

1. Harrington, K.J. and D'Arcy-Evans, C., *Transesterification in situ of sunflower seed oil.* Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development, **1985**. 24(2): p. 314-318.

2. Harrington, K. and D'Arcy-Evans, C., *A comparison of conventional and in situ methods of transesterification of seed oil from a series of sunflower cultivars.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1985**. 62(6): p. 1009-1013.

3. Özgül-Yücel, S. and Türkay, S., *FA monoalkylesters from rice bran oil by in situ esterification.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2003**. 80(1): p. 81-84.

4. Haas, M., Scott, K., Marmer, W., and Foglia, T., *In situ alkaline transesterification: An effective method for the production of fatty acid esters from vegetable oils.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2004**. 81(1): p. 83-89.

5. Pereira, E.B., De Castro, H.F., De Moraes, F.F., and Zanin, G.M., *Kinetic Studies of Lipase from Candida rugosa A Comparative Study Between Free and Immobilized Enzyme onto Porous Chitosan Beads.* Applied Biochemistry and Biotechnology, **2001**. 93: p. 739-752.

6. Kavitha, V., Radhakrishnan, N., Madhavacharyulu, E., Sailakshmi, G., Sekaran, G., Reddy, B.S.R., Rajkumar, G.S., and Gnanamani, A., *Biopolymer from microbial assisted in situ hydrolysis of triglycerides and dimerization of fatty acids.* Bioresource Technology, **2010**. 101(1): p. 337-343.

7. Jachmanian, I. and Mukherjee, K.D., *Germinating Rapeseed as Biocatalyst: Hydrolysis of Oils Containing Common and Unusual Fatty Acids.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1995**. 43(11): p. 2997-3000.

8. Rao, K.V.S.A. and Paulose, M.M., *A process for splitting of castor oil at ambient temperature using homogenized castor seed as lipase source.* Research and Industry, **1992**. 37(1): p. 36-7.

9. Dandik, L. and Aksoy, H., *The kinetics of hydrolysis of Nigella sativa (black cumin) seed oil catalyzed by native lipase in ground seed.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1992**. 69(12): p. 1239-1241.

10. Jachmanian, I., Perifanova-Nemska, M., Grompone, M.-A., and Mukherjee, K.D., *Germinating Rapeseed as Biocatalyst: Hydrolysis of Exogenous and Endogenous Triacylglycerols.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1995**. 43(11): p. 2992-2996.

11. Alibert, G., Mouloungui, Z., and Boudet, A., *Process for producing fatty acids or derivatives thereof from oleoginous plants*. **1996**, Institut National Polytechnique de Toulouse (I.N.P.T.): WO 96/03511. p. 16 pp.

12. Mechling, E., *Mise au point d'un réacteur multitâches adapté à la production des composés oléophiles à partir des milieux réactionnels issus des graines oléagineuses*. **2002**, INP: Toulouse.

13. Mouloungui, Z. and Mechling, E., *Process for preparation of fatty acids by in situ hydrolysis of the lipids contained in seeds of a plant*. **2004**, (INRA, INP Toulouse): FR 2843970. p. 55.

14. Moss, G.P., *Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse.*

15. Gandhi, N.N., *Applications of lipase.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1997**. 74(6): p. 621-634.

16. Foresti, M.L. and Ferreira, M.L., *Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications.* Enzyme and Microbial Technology, **2007**. 40(4): p. 769-777.

17. Weber, N., Weitkamp, P., and Mukherjee, K.D., *Fatty Acid Steryl, Stanyl, and Steroid Esters by Esterification and Transesterification in Vacuo Using Candida rugosa Lipase as Catalyst.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2000**. 49(1): p. 67-71.

18. Varma, M.N. and Madras, G., *Synthesis of Biodiesel from Castor Oil and Linseed Oil in Supercritical Fluids.* Industrial & Engineering Chemistry Research, **2006**. 46(1): p. 1-6.

19. Houde, A., Kademi, A., and Leblanc, D., *Lipases and their industrial applications.* Applied Biochemistry and Biotechnology, **2004**. 118(1): p. 155-170.

20. Hou, C., *Characterization of new yeast lipases.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1997**. 74(11): p. 1391-1394.

21. James, J.J., Lakshmi, B.S., Seshasayee, A.S.N., and Gautam, P., *Activation of Candida rugosa lipase at alkane-aqueous interfaces: A molecular dynamics study.* FEBS Letters, **2007**. 581(23): p. 4377-4383.

22. Pawel, G., Yunge, L., Joseph, D.S., and Miroslaw, C., *Two conformational states of Candida rugosa lipase.* Protein Science, **1994**. 3(1): p. 82-91.

23. Sailas, B. and Ashok, P., *Candida rugosa lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology.* Yeast, **1998**. 14(12): p. 1069-1087.

24. Gautam, P., Sharmila, A., Ravi, S.R., Elavazhagan, M., and Rajesh, S., *Lipase Database.* Bioinformatics Division.

25. Cygler, M. and Schrag, J.D., *Structure and conformational flexibility of Candida rugosa lipase.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, **1999**. 1441(2-3): p. 205-214.

26. Foresti, M.L. and Ferreira, M.L., *Computational Approach to Solvent-Free Synthesis of Ethyl Oleate Using Candida rugosa and Candida antarctica B Lipases. I. Interfacial Activation and Substrate (Ethanol, Oleic Acid) Adsorption.* Biomacromolecules, **2004**. 5(6): p. 2366-2375.

27. Anderson, E.M., Larsson, K.M., and Kirk, O., *One Biocatalyst-Many Applications: The Use of Candida Antarctica B-Lipase in Organic Synthesis.* Biocatalysis and Biotransformation, **1998**. 16(3): p. 181 - 204.

28. Nagayama, K., Yamasaki, N., and Imai, M., *Fatty acid esterification catalyzed by Candida rugosa lipase in lecithin microemulsion-based organogels.* Biochemical Engineering Journal, **2002**. 12(3): p. 231-236.

29. Bordes, F., Fudalej, F., Dossat, V., Nicaud, J.-M., and Marty, A., *A new recombinant protein expression system for high-throughput screening in the yeast Yarrowia lipolytica.* Journal of Microbiological Methods, **2007**. 70(3): p. 493-502.

30. Alibert, G., Mouloungui, Z., Grison, R., and Romestan, M., *Libération des acides gras par autolyse enzymatique des triglycérides des graines oléoprotéagineuses.* Oléagineux, Corps Gras, Lipides, **2001**. 8(1): p. 98-102.

31. Bellemare, B. and Mouloungui, Z. *Functional Proteins Carrying from Full Lipids Matrix (TAG and FFA) to Liquid-Solid Interfaces-Heterogeneous Chemoenzymatic Catalysis Applications*. in *The Research and Development Challenge: How to Improve Uses of Oils and Fats*. **2003**. Bordeaux, France.

32. Bellemare, B., Salim, H., Pontalier, P., and Mouloungui, Z. *Comparaison des performances de trois types de réacteurs pour l'estérification d'acide gras par catalyse enzymatique*. in *Congrès en Génie des Procédés*. **2005**. Paris.

33. Bellemare, B., *Etude de réactions de transfert d'acyles : Synthèse catalytique des esters gras en présence de lipases de micro-organismes chez les plantes oléoprotéagineuses*. **2003**, INP: Toulouse.

34. Dennison, C. and Lovrien, R., *Three Phase Partitioning: Concentration and Purification of Proteins.* Protein Expression and Purification, **1997**. 11(2): p. 149-161.

35. Roy, I., Sharma, A., and Gupta, M.N., *Recovery of biological activity in reversibly inactivated proteins by three phase partitioning.* Enzyme and Microbial Technology, **2005**. 37(1): p. 113-120.

36. Sharma, A., Khare, S.K., and Gupta, M.N., *Three phase partitioning for extraction of oil from soybean.* Bioresource Technology, **2002**. 85(3): p. 327-329.

37. Shah, S., Sharma, A., and Gupta, M.N., *Extraction of oil from Jatropha curcas L. seed kernels by enzyme assisted three phase partitioning.* Industrial Crops and Products, **2004**. 20(3): p. 275-279.

38. Gaur, R., Sharma, A., Khare, S.K., and Gupta, M.N., *A novel process for extraction of edible oils: Enzyme assisted three phase partitioning (EATPP).* Bioresource Technology, **2007**. 98(3): p. 696-699.

39. Fedeniuk, R.W. and Biliaderis, C.G., *Composition and Physicochemical Properties of Linseed (Linum usitatissimum L.) Mucilage.* J. Agric. Food Chem., **1994**. 42(2): p. 240-247.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

L'objectif principal de cette étude a été de créer des milieux émulsionnés, à partir des graines oléoprotéagineuses, en prenant toujours comme modèle la graine de colza. Le procédé intégré développé a été conçu pour réaliser la libération des lipides endogènes de la graine entière dans des conditions opératoires douces, respectueuses de l'environnement, en supprimant tout emploi de solvant organique. Les lipides neutres (TAG), les lipides ioniques (phospholipides) ainsi que les protéines fonctionnelles (oléosines) sont libérés sous forme d'émulsion. La démarche expérimentale a consisté en l'exploitation des propriétés physico-chimiques de ces structures organisées des graines oléoprotéagineuses (les oléosomes) pour la formation des émulsions en présence d'eau. Nous avons développé deux approches : une approche d'ingénierie inverse et une approche générique.

La première phase des travaux présentés au cours de ce mémoire a permis de caractériser et d'élucider le comportement des phospholipides et des oléosines à l'interface huile/eau. Ceci a été possible grâce à une approche d'ingénierie inverse. Suite à des reconstitutions d'émulsions à partir des constituants purifiés et des caractérisations de leur comportement aux interfaces, les résultats d'étude de caractérisation des composants et des systèmes binaires et/ou ternaires ont permis de mieux comprendre le rôle de ces tensioactifs dans la stabilité des films interfaciaux. Les oléosines ont montré une bonne résistance à la coalescence grâce aux propriétés stériques et rhéologiques qu'elles apportent au film interfacial. Les phospholipides, ont exercé des forces répulsives qui ont évité la floculation comme le crémage des reconstitutions. D'autre part, leur ajout en présence des oléosines a amélioré les propriétés rhéologiques. Egalement, un effet synergique a été constaté entre les oléosines et les phospholipides au cours de l'établissement d'isothermes de compression sur balance à film.

La deuxième phase des travaux a développé une approche générique. Elle a été divisée en deux parties : une première partie traite du développement d'un procédé de broyage aqueux des graines entières par des outils mécaniques en présence d'eau. Le broyage aqueux permet la libération des lipides endogènes sous la forme d'oléosomes. En effet, les contraintes

mécaniques ont permis la déstructuration des parois cellulaires de la graine entière pour permettre cette libération. Nous avons constaté que la diminution de la taille des particules favorise cette libération. Lors du broyage aqueux, différentes technologies ont été employées : mélangeur rotor/stator, moulin colloïdal et homogénéisateur haute pression. Leurs atouts comme leurs limites ont été présentés et ont permis de faire un choix de façon à traiter des graines entières de différentes géométries. Ainsi les outils retenus ont été le mélangeur rotor/stator pour la déstructuration des graines entières et l'homogénéisateur haute pression pour la diminution importante de la taille des particules. Ce broyage aqueux est suivi par une séparation centrifuge qui permet de récupérer les différents agroconstituants hydratés en fonction de leur densité. Les oléosomes sont ainsi récupérés sous la forme d'une émulsion native directe contenant les triglycérides.

L'émulsion directe obtenue à la fin de ce procédé a subi une mise en forme capable d'inhiber le développement microbien qui se développerait facilement dans un milieu aqueux riche en nutriments. Cette mise en forme nous permet, grâce à un séchage de l'émulsion native, d'obtenir une poudre autoémulsifiable. Les technologies de lyophilisation et atomisation, avec des principes physiques différents, ont été capables de fournir des émulsions sèches avec des conformations macro et microscopiques distinctes. La réhydratation de ces produits, en présence de tampon Tris et après homogénisation haute pression, a permis de fournir un lubrifiant sous forme d'émulsion biodégradable, non toxique et qui se révèle performante d'après les tests d'usure et extrême pression appliqués en utilisant des références commerciales. De plus, ce biolubrifiant, en provenant d'un procédé qui respecte les principes de la chimie verte, est un bon candidat pour l'écolabellisation.

La deuxième partie de cette approche générique inclut des transformations catalytiques *in situ* réalisées sur la fraction lipidique des graines. Ces transformations ont été catalysées par la lipase de *Candida rugosa* grâce a la présence des films interfaciaux de l'ordre du micron, constitués par des particules de taille et de dispersion homogènes. Cette enzyme présente une activation aux interfaces huile/eau et convient parfaitement à notre système où le substrat est sous forme d'émulsion.

- ✓ La première transformation correspond aux travaux développés précédemment par notre équipe de recherche concernant la transformation *in planta* des triglycérides en acides gras par l'action de la lipase *Candida rugosa*. Cette conversion a lieu lors du

procédé qui permet d'abord la libération des corps lipidiques par broyage aqueux. La lipase est ajoutée dans cette phase de ce broyage pour profiter de l'action des contraintes mécaniques apportées par l'homogénéisateur haute pression qui induisent un contact plus intime entre l'enzyme et les oléosomes. Une incubation du milieu à 37 ºC est mise en place de façon à hydrolyser la totalité des triglycérides. A la fin de l'hydrolyse, une séparation centrifuge permet l'obtention d'un milieu contenant les acides gras sous forme d'émulsion complexe. L'apport de ces travaux de thèse concerne l'évolution technologique qui a été apportée au broyage aqueux ainsi qu'au recyclage de la lipase. A la différence des avancées déjà apportées par notre équipe sur le recyclage de la lipase (la lipase contenue dans l'émulsion avait été recyclée en la fixant sur une résine d'échange d'ions), nous avons proposé le recyclage de la lipase contenue dans la phase aqueuse médiane récupérée à la fin du procédé. Cette démarche permet le recyclage de l'eau et diminue les intrants du procédé. Elle est favorable à l'amélioration du bilan des flux intrants pour l'analyse de cycle de vie.

- ✓ La deuxième transformation catalytique présentée lors de cette démarche générique implique la réutilisation de la lipase contenue dans l'émulsion pour une transformation *post planta*. Cette transformation consiste en l'estérification des acides gras présents dans la fraction émulsionnée. Cette estérification est réalisée en présence d'alcools de quatre et huit atomes de carbone par l'application de la méthode *three phase partitioning*. Cette méthode, qui implique l'incubation du milieu à 37 ºC, permet la séparation des protéines et de deux phases liquides : aqueuse et organique. Cette dernière contient les acides gras ainsi que les esters formés, dissous dans l'alcool employé pour l'estérification.

La lipotransformation *in situ* montre bien la versatilité qu'offre la lipase de *Candida rugosa* pour la catalyse des différentes réactions, en fonction des substrats présents. En même temps, les processus réactionnels des réactions couplées permettent d'exploiter au maximum les intrants (eau et alcool) et de réduire les étapes du schéma intégré. Il a été mis en évidence que l'hydrolyse de triglycérides *in situ* est possible pour d'autres graines oléoprotéagineuses comme le tournesol, le lin et le soja, en utilisant toujours la lipase de *Candida rugosa*. Cependant, la séparation centrifuge n'a pas toujours apporté le même effet que celui obtenu pour la graine de colza. Ainsi, pour les graines de lin et de soja, le milieu s'est séparé en seulement deux phases dont une émulsion directe non compacte.

Dans la continuité de ce travail, il serait pertinent de :

- Développer encore l'approche d'ingénierie inverse de façon à mieux comprendre les interactions de tous les constituants des émulsions de façon à trouver les conditions qui rendront ces émulsions plus stables. Il faudrait caractériser les interactions qui créent l'effet synergique entre les phospholipides et les oléosines, à fin de mieux cerner leurs effets selon les paramètres chimiques, physiques ou physico-chimiques. Il serait aussi important de déchiffrer le rôle joué par les constituants non membranaires, peu étudiés lors de ces travaux.

- Extrapoler le procédé intégré pour l'obtention des émulsions directes de triglycérides avec d'autres graines oléoprotéagineuses avec des tailles, formes et compositions différentes de celles de la graine de colza. Il reste aussi à développer l'opération de séchage de façon à faciliter la réhydratation du produit. Il sera également nécessaire de réaliser le procédé à une échelle pilote dans laquelle toutes les étapes seront bien extrapolées. Ainsi, un schéma intégré sera proposé à partir de chaque espèce végétale. Il fournira des données pour une analyse de cycle de vie plus pertinente qui permettra ainsi une possible écolabellisation.

- Etudier de façon plus approfondie la synthèse d'esters à partir des émulsions contenant des acides gras par la méthode de *three phase partitioning*. Ceci impliquera des modifications dans les conditions opératoires de façon à pouvoir utiliser d'autres alcools comme d'autres graines. Enfin, il nous semble intéressant de pouvoir tester l'effet que peut apporter l'homogénéisateur haute pression lors de cette synthèse.

- Etudier les relations entre les propriétés physico-chimiques d'émulsions natives à base de triglycérides ou d'esters gras et d'acides gras et leur pouvoir lubrifiant pour développer des nouveaux fluides fonctionnels émulsionnables performants, à bas intrants et écolabellisables.

Partie Expérimentale

A.1 Méthodes d'analyse 213
A.1.1 Teneur en eau et en matières volatiles 213
A.1.2 Teneur en matière minérale 214
A.1.3 Teneur en lipides sur une matière sèche 214
A.1.4 Teneur en phosphore 215
A.1.5 Teneur en protéines par la méthode de Kjeldahl 215
A.1.6 SDS-PAGE 216
A.1.7 Teneur en constituants pariétaux 218
A.1.8 Potentiel zêta 219
A.1.9 Isothermes d'adsorption 220
A.2 Méthodes chromatographiques 220
A.2.1 Composition en glycérides 220
A.2.2 Composition en acides gras 221
A.2.3 Teneur en stérols 222
A.2.4 Teneur en tocophérols 222
A.2.5 Analyse des phospholipides par HPLC 223
A.2.6 Composition d'acides aminés 224
A.3 Méthodes microscopiques 224
A.3.1 Microscopie électronique à balayage 224
A.3.2 Observation à la loupe binoculaire pour la détermination de la taille des particules solides 224
A.3.3 Observation par microscopie optique pour la détermination de la taille des gouttelettes 225

Partie Expérimentale

Dans ce dernier chapitre, nous présentons les méthodes analytiques employées au cours de ces travaux de thèse. Celles-ci n'ont pas été présentées au long des chapitres.

A.1 Méthodes d'analyse

A.1.1 Teneur en eau et en matières volatiles

La teneur en eau et en matières volatiles (ou humidité), est déterminée selon la norme française NF V 03-909. Elle correspond à la perte de masse subie par l'échantillon après chauffage dans une étuve à 103 ± 2 °C jusqu'à poids constant. La teneur en eau et en matières volatiles est exprimée en pourcentage massique :

$$\%\ Eau(= humidité(H)) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} * 100$$

où :

m_0 est la tare de la coupelle en g

m_1 est la masse de la coupelle et de la prise d'essai avant chauffage en g

m_2 est la masse de la coupelle et du résidu après chauffage jusqu'à poids constant en g

Exprimée aussi en pourcentage en masse, la teneur en matière sèche de l'échantillon, se déduit de la valeur de H :

$$\%\ \text{Matière Sèche} = 100 - \text{H} = \frac{\text{m}_2 - \text{m}_0}{\text{m}_1 - \text{m}_0} * 100$$

A.1.2 Teneur en matière minérale

La teneur en matière minérale (ou cendres minérales) est déterminée selon la norme française NF V 03-322. L'échantillon subit une calcination dans un four à 550 °C jusqu'à poids constant. La teneur en matières minérales est exprimée en pourcentage massique et est égale à :

$$\% \text{ Minéraux} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100$$

où :

m_0 est la tare du creuset en g

m_1 est la masse du creuset et de la prise d'essai avant chauffage en g

m_2 est la masse du creuset et du résidu après calcination jusqu'à poids constant en g

A.1.3 Teneur en lipides sur une matière sèche

La teneur en lipides a été déterminée sur des matières sèches à l'aide d'un appareil d'extraction accélérée type DIONEX ASE 200 Accelerated Solvent Extractor (Idstein, Germany) pour lequel des conditions opératoires ont préalablement été optimisées :

- 105°C pour la température du four.
- 90 bars pour la pression au sein de la cartouche.
- 10 cycles d'extraction de dix minutes.

Ainsi la teneur en lipides exprimée en pourcentage massique est égale à :

$$\% \text{ Lipides} = \frac{m_2 - m_0}{m_1} * 100$$

où :

m_0 est la tare du ballon en g

m_1 est la masse de la prise d'essai en g

m_2 est la masse du ballon et de l'extrait lipidique après séchage en g

Les résultats de ces analyses sont comparables à ceux obtenus selon la norme française NF V 03-908 à l'aide d'un appareil d'extraction continue (Soxhlet).

A.1.4 Teneur en phosphore

La teneur en phosphore est déterminée selon la norme française NF T 60-227. Après incinération de l'échantillon et attaque des cendres formées lors de la minéralisation par l'acide nitrique, l'ajout de réactif vanadomolybdique permet la formation d'un complexe phosphovanadomolybdique de couleur jaune entre les ions phosphoriques, vanadiques et molybdiques. Mesurée par spectroscopie UV à 460 nm et sur un appareil Hewlett Packard 8542 A (Downers Grove, Illinois, USA), l'intensité de la coloration est rapportée à une courbe d'étalonnage préalablement établie à l'aide d'une solution étalon d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4). Elle permet de déterminer la quantité d'ions phosphates présents et donc la teneur en phosphore de l'échantillon d'huile analysé.

A.1.5 Teneur en protéines par la méthode de Kjeldahl

La teneur en protéines est déterminée par la méthode du Kjeldahl selon la norme française NF V 18-100. Cette méthode consiste à transformer, par minéralisation, l'azote organique contenu dans l'échantillon traité en azote minéral (ammoniac) puis à doser cet ammoniac.

La minéralisation de la prise d'essai (entre 0,5 à 1,5 grammes d'échantillon selon la teneur estimée en protéines) est effectuée par l'acide sulfurique concentré (12,5 mL à 95 %) en présence de deux pastilles de catalyseur (à base de $CuSO_4$ et K_2SO_4). Les tubes contenant les prises d'essai avec l'acide et le catalyseur sont chauffés à 400 °C à l'aide d'un appareil Tecator Digestor 2020, FOSS (Hoganas, Suède), jusqu'à l'obtention d'une coloration bleu turquoise (entre 1.5 et 2 heures). Les produits de la réaction sont alors alcalinisés par une solution de soude à 40 %.

$$CHON_{\text{protéines}} + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4 + H_2O + CO_2$$

Minéralisation avec l'acide sulfurique

$$(NH_4)_2SO_4 + 2\ NaOH \rightarrow 2\ NH_3 + Na_2SO_4 + 2\ H_20$$

Réaction d'alcalinisation par la soude

Après refroidissement, l'ammoniac produit est entraîné de façon automatique par distillation à la vapeur à l'aide d'un appareil Tecator Kjeltec 2200, FOSS (Hoganas, Suède). Afin de déterminer la teneur en azote total de la matière organique, l'ammoniac est ensuite titré par une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 N grâce au virage d'un mélange d'indicateurs colorés en solution dans de l'acide borique à 4 %, le vert de bromocrésol et le rouge de méthyle. Par convention, la teneur en protéines de l'échantillon est alors obtenue en multipliant la teneur en azote total par un facteur de conversion empirique. Ce coefficient (6,25) prend en compte la masse molaire moyenne des acides aminés composant les protéines à quantifier. La teneur en protéines exprimée en pourcentage massique est égale à :

$$\%\ \text{Protéines} = 6{,}25 * \frac{M_N * C * (V_1 - V_0)}{m} * 100$$

où :

M_N est la masse molaire de l'azote (14,007 g/mol)

C est la concentration de la solution d'acide chlorhydrique en mol/L

V_0 est le volume utilisé de la solution d'acide chlorhydrique sur un échantillon blanc en mL

V_1 est le volume utilisé de la solution d'acide chlorhydrique sur l'échantillon en mL

m est la masse de la prise d'essai en mg

A.1.6 SDS-PAGE

Les protéines sont séparées en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10 x 8 cm) en conditions dénaturantes, à l'aide d'un gel de concentration à 5 % et d'un gel de séparation à 12 %.

Gel de séparation	mL	Gel de concentration	mL
▪ Acrylamide/bis (30 % T, 2.67 % C)	4,0	▪ Acrylamide/bis (30 % T, 2.67 % C)	1,7
▪ 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	2,5	▪ 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	2,5
▪ SDS 10 % (w/v)	0,1	▪ SDS 10 % (w/v)	0,1
▪ TEMED	0,005	▪ TEMED	0,01
▪ Persulfate d'ammonium 10 % (w/v)	0,05	▪ Persulfate d'ammonium 10 % (w/v)	0,05
▪ Eau deminéralisée	3,4	▪ Eau deminéralisée	5,7

Cent microlitres de préparation, contenant 4 volumes de tampon de charge dénaturant (contenant 5 % de β-mercaptoéthanol) par volume de solution de protéines (environ 2 g/L de protéines), sont incubés pendant 4 min à 95 °C avant leur dépôt dans les puits du gel (20 µL).

Tampon de charge dénaturant	mL	Tampon de migration (x10)	g
▪ Eau deminéralisée	3.55	▪ Tris base	30,3
▪ Tris-HCl, pH 6.8	1.25	▪ Glycine	144,0
▪ Glycérol	2,5	▪ SDS	10,0
▪ SDS 10 % (w/v)	2,0	▪ Ajuster à 1000 mL avec de l'eau déminéralisée	
▪ Bleu de bromophénol	0,2		
▪ 50 µL β-mercaptoéthanol par 950 µL de tampon			

Pour déterminer la taille des protéines, un marqueur est déposé dans un puit du même gel (10 µL). Les marqueurs sont des solutions de protéines avec des tailles bien connues. Le marqueur employé couvre des tailles protéiques de 4 kDa à 250 kDa.

La migration s'effectue en appliquant un champ électrique de 200 V dans la cuve de migration. La conduction des électrodes aux gels se fait grâce au tampon d'électrode Tris-Glycine. Après 30 à 45 min de migration, il est nécessaire de colorer les protéines grâce au tampon de coloration. Cette coloration peut prendre plusieurs heures (minimum 2 h). Le gel est entièrement bleu après cette étape. Afin de bien révéler les bandes correspondant aux dépôts de protéines de masse moléculaire distincte, il est nécessaire de décolorer le gel suffisamment pour qu'il soit incolore, mais pas trop pour éviter d'effacer des bandes de faible intensité. Le tampon de décoloration devra être renouvelé aussi souvent que nécessaire. Cette étape nécessite une surveillance de l'avancement de la décoloration du gel.

A.1.7 Teneur en constituants pariétaux

La teneur en constituants pariétaux (hémicelluloses, lignines et cellulose) est estimée par la méthode de Van Soest et Wine[1]. Basée sur la différence de solubilité des constituants dans deux types de détergents, cette méthode gravimétrique se pratique à partir d'échantillons préalablement séchés, déshuilés et réduits sous forme de poudre afin de rendre le milieu le plus homogène possible (de 0,8 à 1,0 gramme par prise d'essai). Les réactions d'attaque de la matière végétale sont alors effectuées dans des frittés spéciaux, de porosité 2 et prévus pour s'adapter sur l'appareil Fibertec™1020, FOSS (Hoganas, Suède). Lors d'une attaque avec un détergent neutre (NDF, Neutral Detergent Fiber), à base d'EDTA, l'ensemble des constituants non pariétaux est solubilisé. La fraction organique du résidu insoluble représente alors la somme des constituants suivants : hémicelluloses, lignines et cellulose.

L'attaque se fait par ajout à l'échantillon à analyser de 100 mL d'une solution composée de sodium lauryl sulfate, d'EDTA, de phosphate disodique, de borate de sodium décahydrate et d'éthylène glycol monoéthyl éther. Après une heure à ébullition, les réactifs sont éliminés par aspiration et le résidu est abondamment rincé à l'eau bouillante jusqu'à disparition de la mousse. Puis, il est séché à l'étuve à 103 ± 2°C pendant 12 heures et calciné dans un four à 550 °C pendant 3 heures. La pesée du fritté après séchage et calcination permet la détermination de la teneur globale en pourcentage massique de constituants pariétaux :

$$\% \text{ Pariètaux} = \frac{m_2 - m_3}{m_1 - m_0} * 100$$

où :

m_0 est la tare du fritté en g

m_1 est la masse du fritté et de la prise d'essai avant l'attaque en g

m_2 est la masse du fritté et du résidu après l'attaque et séchage en g

m_3 est la masse du fritté et du résidu après calcination en g

1

A.1.8 Potentiel zêta

L'échantillon est tout d'abord dilué à une concentration de 0.1 à 10 % de matière sèche, idéalement inférieure à 1 %. Il est ensuite filtré avec une membrane en nitrate de cellulose d'une porosité inférieure à 10 µm (limite de détection de l'appareil) avant de l'introduire dans une cellule de mesure constituée d'un capillaire reliant deux électrodes. La cellule est placée dans l'appareil Zetasizer NanoZS de Malvern Instruments S.A. (Orsay, France). Après stabilisation de la cuvette à 25 °C, la mesure est lancée et répétée deux fois. Par application d'un champ électrique, les particules chargées vont se déplacer d'une électrode à l'autre. La mobilité électrophorétique est alors mesurée par effet laser doppler.

Les particules dispersées dans la cellule diffusent la lumière lorsqu'elles passent devant le faisceau laser. Cette onde diffusée présente un décalage en fréquence (et phase) qui est fonction de la vitesse des particules. Ce décalage est mesuré par interférométrie. Pour obtenir le potentiel Zeta, on utilise la loi de Henry qui relie ce dernier à la mobilité mesurée :

$$\zeta = \frac{3 * \mu * \eta}{2 * \varepsilon * f(\kappa a)}$$

où :

ε est la constante diélectrique

ζ est le potentiel zêta

η est la viscosité

f(κa) est la fonction de Henry

κ est le paramètre de Debye

a est le rayon de la particule

µ est la mobilité électrophorétique

Le paramètre de Debye rend compte de l'épaisseur de la double couche ionique entourant les particules. Plusieurs modèles sont disponibles pour calculer la fonction de Henry. Pour un milieu avec une concentration élevée en sel ou milieu polaire, la double couche est comprimée et nous pouvons alors utiliser le modèle de Smoluchowsky avec κa>1 et f(κa)=1.5.

A.1.9 Isothermes d'adsorption

Cette analyse est réalisée à l'aide de l'appareil Dynamic Vapor Sorption, Surface Measurement Systems LTD. (Londres, Angleterre), qui réalise des mesures des absorptions ou des pertes de vapeur de façon gravimétrique à l'aide d'une ultra-microbalance. L'échantillon est placé à l'intérieur de l'équipement pour suivre une méthode automatique. Un préchauffage de 360 min à 103 °C est réalisé afin de terminer la déshydratation de l'échantillon.

Les mesures nécessaires à l'obtention d'un isotherme d'adsorption sont réalisées sur 8 paliers d'humidité relative (HR) qui vont de 0,00 % à 90,00 % à 25,0°C. Les paliers changent quand la variation de masse est inférieure ou égale à $5x10^{-4}$ g pendant au moins 5min, ou bien après 10h à une même HR.

A.2 Méthodes chromatographiques

A.2.1 Composition en glycérides

L'analyse de la composition des glycérides est réalisée par une méthode en chromatographie en phase gazeuse avec l'aide d'un équipement AutoSystem XL, Perkin-Elmer (Nothwalk, Connecticut, USA), doté d'une colonne de silice CP-Sil 8 CB MS (Varian), de 15 m de longueur avec un diamètre interne de 0,32 mm, et une épaisseur de film de 0,25 µm et une pré-colonne en méthyle désactivé. La détection se réalise à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La méthode programmée et utilisée pour l'analyse par CPG est la suivante :

- Injection directe : 1µL d'extrait
- Gaz vecteur : hélium
- Programmation du four :
  - maintien à 55 °C pendant 0,5 min
  - de 55 °C à 80 °C à 45 °C/min
  - de 80 °C à 360 °C à 10 °C/min
  - maintien à 360 °C pendant 16 min
- Température du détecteur : 365 °C

Ces conditions permettent de séparer efficacement les acides gras des mono-, di- et triglycérides à partir d'un extrait de lipide contenant 2 mg de lipides par mL de cyclohexane. A 160 µL de cet extrait sont ajoutés 40 µL de MSHFBA (Methyl trimethylsilyl heptafluorobutyramide), qui permettent de silyler les fonctions acides et alcools présentes, pour obtenir des pics mieux définis. Après ajout du réactif, l'échantillon est chauffé à 103 °C pendant 5 minutes avant d'être injecté en chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse. La quantification se fait par étalonnage externe, avec un mélange d'acide oléique, de monooléine, dioléine et trioléine de chez Sigma (Saint Louis, USA).

A.2.2 Composition en acides gras

La détermination du profil en acides gras des lipides se fait par méthylation des lipides à l'aide du TMSH (hydroxyde de triméthylsulfonium 0,5 M dans le méthanol). Les esters méthyliques d'acides gras ainsi obtenus lors de la transestérification sont analysés par chromatographie en phase gazeuse en utilisant les paramètres suivants :

- Colonne × 0,32 mm, film de 25 µm d'épaisseur
- Gaz vecteur : hélium (débit de 1,5 mL/min)
- Température du four :
  - maintien à 100 °C pendant 1 min
  - de 100 °C à 160 °C à 10 °C/min
  - de 160 °C à 200 °C à 1 °C/min
  - de 200 °C à 230 °C à 10 °C/min
  - maintien à 230 °C pendant 10 min
- Détecteur FID : 300 °C.
- Injecteur : Split 100 à 280 °C.

L'identification des pics chromatographiques se fait par comparaison avec des mélanges standardisés de chez Sigma (Saint Louis, USA).

A.2.3 Teneur en stérols

La détermination des stérols se fait par saponification des lipides à l'aide d'une solution de KOH 1 M dans l'éthanol en présence d'un étalon interne (cholestanol). Les insaponifiables sont ensuite extraits avec un mélange eau/cyclohexane 1 : 6 (v/v). Ensuite, à 160 µL de la phase hexanique sont ajoutés 40 µL de réactif de silylation (1 mL MSHFBA + 50 µL 1-methyl imidazole) qui permettent de silyler les stérols, pour obtenir des pics mieux définis. Après ajout de réactif, l'échantillon est chauffé à 103 °C pendant 5 minutes avant d'être injecté en chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse à l'aide d'un équipement Perkin-Elmer doté d'une colonne de silice CP-Sil 8 CB (Varian), de 30 m de longueur avec un diamètre interne de 0,25 mm, et une épaisseur de film de 0,25 µm. La détection se réalise à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La méthode programmée et utilisée pour l'analyse par CPG est la suivante :

- Injection : 1µL d'extrait
- Gaz vecteur : hélium, pression en tête de colonne de 100 kPa
- Programmation de l'injecteur :
  - maintien à 55 °C pendant 0,5 min
  - de 55 °C à 340 °C à 200 °C/min
  - maintien à 340 °C pendant 30 min
- Programmation du four :
  - maintien à 160 °C pendant 0,5 min
  - de 160 °C à 260 °C à 20 °C/min
  - de 260 °C à 300 °C à 2 °C/min
  - de 300 °C à 350 °C à 45 °C/min
- Température du détecteur : 350 °C

A.2.4 Teneur en tocophérols

L'analyse des tocophérols a été déterminée par une méthode chromatographique en HPLC Dionex (Idstein, Germany). Une colonne Kromasil 100 SIL (Bohus, Suède), 250 x 4 mm, avec un diamètre de particule de 5 µm a été utilisée. Une solution contenant environ exactement 10 mg d'huile/mL de cyclohexane est préparée pour l'analyse. La

quantification se fait par étalonnage externe. La méthode programmée et utilisée pour l'analyse a été la suivante :

- Volume d'injection : 20 µL
- Débit : 1,1 mL/min
- Eluant : Isooctane 99,5 % / Isopropanol 0,5 %
- Détecteur : Fluorimètre

  λex. = 290 nm

  λem. = 317 nm

A.2.5 Analyse des phospholipides par HPLC

L'analyse des phospholipides a été déterminée par une méthode chromatographique en HPLC. Une colonne de silice Prevail, Alltech Associates Inc. (Deerfield, Illinois, USA), 150 x 3.2 mm, avec un diamètre de particule de 3 µm et une pré-colonne avec le même remplissage et diamètre interne, ont été utilisées. La méthode programmée pour l'analyse a été la suivante :

- Volume d'injection : 20 µL
- Débit : 0,5 mL/min
- Température : 40 °C
- Programme d'élution : un gradient linéaire de 87,5:12:0,5 v/v/v à 28:60:12 v/v/v de chloroforme/méthanol/tampon de triethylamine (pH 3 et 1 M d'acide formique) de 0 min à 16 min est effectué, pour ensuite le ramener au rapport initial à la minute 17 et permettre l'équilibre de la colonne jusqu'à l'injection suivante à la minute 26.

Un système de détection à diffusion de lumière a été utilisé. Le solvant sortant de la colonne est évaporé et amené par un courant d'azote dans une chambre chauffante. Le soluté est nébulisé et, sous la forme de petites gouttelettes, passe à travers un faisceau de lumière qui est alors réfléchi et réfracté. La lumière diffusée, mesurée par un tube photomultpilicateur correctement positionné est directement reliée à la quantité de produit dans l'éluant.

A.2.6 Composition d'acides aminés

La détermination de la composition en acides aminés d'une protéine a été réalisée en accord à la méthode de Moore et Stein. Les échantillons sont hydrolysés avec de l'acide chlorhydrique 6 N à 103 ºC pendant 24 heures. Les acides aminés libres sont ensuite séparés par chromatographie d'échange d'ion. L'analyse est réalisée à l'aide d'un analyseur d'acides aminés Biochrom 20+ Biochrom Ltd. (Cambridge, UK) équipé d'un système « colonne + pré-colonne » avec des résines échangeuses d'ions à base de sodium, de taille 200 x 4,6 mm. La séparation des acides aminés est effectuée par une élution avec des tampons de pH différents à une certaine température. Les acides aminés, après réaction avec de la nihydrine sont détectés à une longueur d'onde de 570 nm, à l'exception de la proline pour laquelle la détection a lieu à 440 nm.

A.3 Méthodes microscopiques

A.3.1 Microscopie électronique à balayage

L'observation des solides se fait à l'aide du microscope électronique à balayage LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd. (Thornwood, NY, USA). Avant toute observation, les échantillons sont préalablement déshydratés (deux à trois jours sous vide). Puis, ils sont métallisés à l'argent, sous plasma d'argon (métallisation sputtering). Les images sont enregistrées via le logiciel LEO 32.

A.3.2 Observation à la loupe binoculaire pour la détermination de la taille des particules solides

Les échantillons sont observés à leur humidité d'équilibre à l'aide d'une loupe binoculaire Nikon SMZ 1500, Nikon France S.A.S. (Champigny Sur Marne, France). Celle-ci est équipée de la caméra numérique Nikon DMX 1200 reliée à un ordinateur. Le logiciel Lucia G (version 5.3) permet la récupération des images. La répartition de la taille des particules solides peut être évaluée plus précisément à l'aide du logiciel Lucia G par mesure manuelle des particules solides présentes sur l'image. La distribution des mesures est alors présentée sous forme d'histogramme.

A.3.3 Observation par microscopie optique pour la détermination de la taille des gouttelettes

Déposées au préalable entre lame et lamelle, les phases émulsionnées sont observées à l'aide du microscope optique Nikon Eclipse E 600, Nikon France S.A.S. (Champigny Sur Marne, France) muni d'oculaires grossissants ×10 et d'un objectif ×100 (objectif à immersion dans l'huile). Le microscope est équipé de la caméra numérique Nikon DMX 1200 reliée à un ordinateur. Le logiciel Lucia G (version 5.3) permet la récupération des images. La répartition de la taille des gouttelettes peut être évaluée plus précisément à l'aide du logiciel Lucia G par mesure manuelle ou automatique des diamètres moyens des gouttelettes présentes sur l'image. La distribution des mesures est alors présentée sous forme d'histogramme.

ELABORATION DES EMULSIONS NATIVES ISSUES DES GRAINES OLEOPROTEAGINEUSES ET TRANSFORMATION CATALYTIQUE DE LA FRACTION LIPIDIQUE EN BIOLUBRIFIANTS ECOLABELLISABLES

Résumé :

Les recherches que nous présentons dans ce mémoire s'inscrivent dans le cadre du projet européen IBIOLAB* qui vise à la création de biolubrifiants écolabellisables. Tout d'abord, une approche d'ingénierie inverse a été réalisée pour déterminer le rôle des tensioactifs natifs des graines oléoprotéagineuses dans la stabilisation des oléosomes dans l'eau. Ceci a permis par la suite une approche générique avec la mise en œuvre d'un procédé intégré qui permet la libération des lipides sous forme émulsionnée. Une étape optionnelle consiste en l'hydrolyse enzymatique *in situ* des triglycérides. L'activité de la lipase utilisée a été évaluée lors d'une étude d'estérification des acides gras avec différents alcools par une méthode de séparation triphasique (TPP three-phase partitioning).

Mots-clés : Graines oléoprotéagineuses, émulsion, oléosome, tensioactifs natifs, oléosines, phospholipides, procédé intégré, transformation catalytique *in situ*, lipase, colza, biolubrifiant, séparation triphasique.

ELABORATION OF NATIVE EMULSIONS FROM OILSEEDS AND CATALYTIC TRANSFORMATION OF LIPID FRACTION INTO ECOLABELLED BIOLUBRICANTS

Abstract:

The present work was performed within the framework of the European project IBIOLAB* which aims to create environmentally friendly biolubricants (able to be eco-labelled). First of all, a reverse engineering methodology was developed to understand the role of oilseed native surfactants in the stability of oil-bodies in water. Subsequently, using a general approach, it was possible to develop a process that allows releasing the lipid fraction into an emulsion. If an *in-situ* enzymatic hydrolysis of triglycerides is added to this process, an emulsion containing the free fatty acids will be obtained. The activity of the remaining lipase in the emulsion was used to study the esterification of free fatty acids with different alcohols using a three-phase partitioning method.

Keywords: Oilseeds, emulsion, oleosome, native surfactants, oleosins, phospholipids, integrated process, *in situ* catalytic transformation, lipase, colza, biolubricant, three-phase partitioning.

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle – UMR 1010 INRA / INP-ENSIACET
4, allée Emile Monso - BP 44362 31030 Toulouse Cedex 4 FRANCE

* *Improvement of Biolubricant Manufacturing and Development thanks to the Obtaining of EcoLABels in a wide Range of Industrial Sectors. Project no.: COLL-CT-2006-030307.*