



(11) **EP 1 537 194 B1**

(12) **FASCICULE DE BREVET EUROPEEN**

(45) Date de publication et mention
de la délivrance du brevet:
31.10.2012 Bulletin 2012/44

(51) Int Cl.:
C11B 1/02 ^(2006.01) **C11B 1/04** ^(2006.01)
C11C 1/04 ^(2006.01)

(21) Numéro de dépôt: **03769562.4**

(86) Numéro de dépôt international:
PCT/FR2003/002636

(22) Date de dépôt: **03.09.2003**

(87) Numéro de publication internationale:
WO 2004/022677 (18.03.2004 Gazette 2004/12)

(54) **PROCEDE DE PREPARATION D'ACIDES GRAS PAR HYDROLYSE IN SITU DES LIPIDES
CONTENUS DANS LES GRAINES D'UNE PLANTE**

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON FETTSÄUREN DURCH IN SITU HYDROLYSIS VON
LIPIDEN AUS LIPIDEN ENTHALTENDEN PFLANZENSAMEN

METHOD FOR PREPARING FATTY ACIDS BY HYDROLYZING I IN SITU /I LIPIDS CONTAINED
IN A PLANT SEEDS

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HU IE IT LI LU MC NL PT RO SE SI SK TR**

(56) Documents cités:
**EP-A- 0 148 143 EP-A- 0 619 950
WO-A-01/88961 DE-A- 3 843 027
FR-A- 2 283 902 US-A- 3 640 725
US-A- 5 616 215**

(30) Priorité: **04.09.2002 FR 0210942**

(43) Date de publication de la demande:
08.06.2005 Bulletin 2005/23

(73) Titulaires:
• **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE
(INRA)
75338 Paris Cédex 07 (FR)**
• **INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE TOULOUSE (I.N.P.T.)
31029 Toulouse Cédex 4 (FR)**

- **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, vol. 43, 1995, pages
2992-2996, XP002241424 cité dans la demande**
- **TURNER, C. AND MCKEOWN, T.: "The use of
immobilised Candida antarctica lipase for
simultaneous supercritical fluid extraction and
in-situ methanolysis of cis-Vaccenic acid in
Milkweed seeds" JOURNAL OF THE AMERICAN
OIL CHEMISTS' SOCIETY., vol. 79, no. 5, mai 2002
(2002-05), pages 473-478, XP002241425
AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY.
CHAMPAIGN., US ISSN: 0003-021X**

(72) Inventeurs:
• **MOULOUNGUI, Zéphirin
F-31520 RAMONVILLE SAINT-AGNE (FR)**
• **MECHLING, Eric
F-14100 LISIEUX (FR)**

(74) Mandataire: **Michelet, Alain et al
Cabinet HARLE et PHELIP
14-16, rue Ballu
75009 Paris (FR)**

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la publication de la mention de la délivrance du brevet européen au Bulletin européen des brevets, toute personne peut faire opposition à ce brevet auprès de l'Office européen des brevets, conformément au règlement d'exécution. L'opposition n'est réputée formée qu'après le paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

EP 1 537 194 B1

Description**DOMAINE DE L'INVENTION**

- 5 **[0001]** La présente invention se rapporte au domaine de la préparation d'acides gras à partir des lipides contenus dans les graines de certains végétaux.

ETAT DE LA TECHNIQUE

- 10 **[0002]** Les acides gras sont des acides carboxyliques ayant divers degrés d'insaturation et une grande variété de poids moléculaires. Les acides gras sont utilisés dans la fabrication d'une grande variété de produits, tels que les savons et les tensioactifs, les lubrifiants, les peintures et les revêtements, ou encore les bougies, ainsi que dans une grande diversité d'autres produits de l'agriculture et de l'industrie, notamment dans le domaine agroalimentaire.
- 15 **[0003]** Classiquement, les acides gras sont produits par hydrolyse chimique d'une huile, par exemple par l'action de la chaleur et de la pression en présence d'eau, afin de rompre les liaisons entre l'acide et l'alcool constitutifs des lipides contenus dans les huiles.
- [0004]** Bien que les acides gras ont été produits par synthèse chimique, une partie importante de ces derniers est préparée à partir d'huiles naturelles.
- 20 **[0005]** On connaît aussi des procédés de préparation d'acides gras par hydrolyse d'un milieu contenant des lipides sous l'action d'une lipase capable d'hydrolyser les lipides respectivement en acides gras et alcools, principalement le glycérol. L'hydrolyse de l'huile d'olive en utilisant la lipase de *Candida rugosa* a été décrite par LINFIELD et al. (LINFIELD W M et al., 1984, J. AM. Oil Chem. Soc. vol. 61:1067-1071). Cependant, l'hydrolyse nécessitait un traitement préalable de l'huile substrat de départ avec une terre de blanchiment.
- 25 **[0006]** L'hydrolyse de l'huile de soja par la lipase a été décrite par PARK et al. (PARK Y K et al. 1988, J. Am. Oil Chem. Soc., vol. 61: 252-254). Cependant une lipolyse presque complète nécessitait l'utilisation de deux lipases distinctes.
- [0007]** Le brevet américain publié sous le n°US 5,932,458 décrit un procédé d'hydrolyse d'une huile à l'aide d'une lipase immobilisée. Notamment, la lipase peut être obtenue par broyage de graines d'avoine, puis élimination des lipides par extraction avec un solvant. Pour effectuer la réaction d'hydrolyse, la lipase immobilisée est ensuite mise en contact avec de l'huile de soja dans un solvant organique, le 2,2,4-triméthylpentane.
- 30 **[0008]** RAO et al. (RAO KSVA et al., 1992, Res. Ind., vol.37 :36) décrivent une méthode d'hydrolyse utilisant un broyat de graines de ricin, dans lequel la lipase endogène de la graine, qui est libérée des sphérosomes intracellulaires par le broyage des graines, est utilisée pour hydrolyser les lipides endogènes de ces graines broyées. De même, JACHMANIAN et al. (JACHMANIAN I et al., 1995, J Agric. Food Chem. vol. 43(11): 2992-2996) ont étudié l'hydrolyse des lipides d'un broyat de graines de colza germées, sous l'action de la lipase endogène.
- 35 **[0009]** Le brevet américain n° US 3,640,725 décrit un procédé de préparation d'un extrait de protéines à partir de graines de soja. Le procédé de ce document antérieur comprend notamment une étape d'incubation d'une pâte obtenue à partir de graines de soja broyées avec une composition d'enzymes protéolytiques.
- [0010]** Toutefois, ces études d'hydrolyse des lipides par les lipases endogènes impliquent de choisir précisément le stade de développement des graines utilisées, puisque les lipases ne sont produites qu'au moment de la germination.
- 40 **[0011]** De plus, ces études visent exclusivement à montrer que les graines entières sont des sources de lipase. Aucun essai d'extraction des acides gras et des alcools n'est donc décrit.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

- 45 **[0012]** Le demandeur s'est attaché à mettre au point un procédé amélioré de préparation d'acides gras, par hydrolyse des lipides contenus dans les graines d'une plante, qui soit simple, rapide, et qui permette l'obtention d'un haut rendement d'hydrolyse. En particulier, le demandeur s'est attaché à mettre au point un procédé amélioré ne nécessitant pas une étape d'extraction de l'huile préalable à la mise en contact de la lipase avec les lipides dont l'hydrolyse, respectivement
- 50 en acides gras et alcools, est recherchée.
- [0013]** De manière surprenante, on a montré selon l'invention qu'une hydrolyse quasi-complète des lipides contenus dans des graines de plantes pouvait être obtenue en faisant agir une lipase exogène dans un milieu réactionnel hétérogène solide/liquide dans lequel le substrat lipidique est présent.
- [0014]** Plus précisément, on a montré selon l'invention, qu'une lipase exogène placée dans un milieu réactionnel substrat hétérogène solide/liquide, lequel milieu réactionnel est soumis à un traitement d'homogénéisation drastique à haute pression ou par ultrasons, conserve son activité catalytique d'hydrolyse des lipides contenus dans la solution substrat ainsi traitée.
- 55 **[0015]** On a également montré selon l'invention qu'une lipase exogène était capable d'effectuer une hydrolyse complète

ou quasi-complète des lipides présents, dans ce milieu réactionnel hétérogène solide/liquide, sous la forme d'une émulsion constituée de gouttelettes d'huile dispersées dans un milieu aqueux, et que les acides gras résultant de l'hydrolyse des lipides contenus dans ladite émulsion pouvaient être facilement récupérés, par exemple par simple extraction.

[0016] Il a enfin été montré selon l'invention qu'un traitement de graines de plantes par broyage et homogénéisation permettait de rendre accessible la plus grande partie des lipides initialement contenus dans les graines à l'action d'une lipase exogène.

[0017] La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'acides gras par hydrolyse *in situ* des lipides contenus dans les graines d'une plante, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) broyage des graines en milieu aqueux jusqu'à l'obtention d'une suspension de particules solides d'un diamètre inférieur à 500 μm ;
- b) ajout d'une lipase exogène dans la suspension obtenue à l'étape a) ;
- c) homogénéisation de la suspension contenant la lipase jusqu'à l'obtention d'un homogénat constitué d'une émulsion des lipides contenus initialement dans les graines, en mélange avec les particules solides des graines ;
- d) hydrolyse des lipides contenus dans l'homogénat obtenu à l'étape c) à une température comprise entre 15°C et 55°C, pendant une durée comprise entre 15 minutes et 5 heures ;
- e) récupération des acides gras résultant de l'hydrolyse des lipides réalisée à l'étape d).

Etape de broyage des graines

[0018] Selon le procédé ci-dessus, l'étape a) de broyage est réalisée à l'aide d'un broyeur à couteaux de type « Waring Blendor » dans un milieu aqueux. En général, l'obtention de particules solides d'un diamètre moyen inférieur à 500 μm peut être obtenu par une durée de broyage des graines dans le milieu aqueux de quelques minutes, de préférence entre 1 et 10 minutes et de manière tout à fait préférée entre 2 et 7 minutes, par exemple pendant une durée de 5 minutes.

[0019] Le milieu aqueux de broyage est préférentiellement de l'eau mais peut être également toute solution tampon, telle que par exemple les deux solutions tampons ci-dessous :

- Tampon phosphate 0,1M obtenu à partir du dihydrogénophosphate de sodium dihydrate $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et équilibré à pH 7,0 avec l'hydroxyde de sodium NaOH .
- Tampon tris (hydroxyméthyl) aminométhane ajusté à pH 7 avec de l'acide chlorhydrique.

[0020] Autres milieux d'hydrolyse : réactivité en milieu NaCl 0,1M.

[0021] Toutefois, le recours à une solution tampon n'est pas privilégiée car une solution tampon est susceptible d'introduire des composés contaminants indésirables qu'il est difficile ou long d'éliminer, dans la suite du procédé.

[0022] De préférence, lors de l'étape a) de broyage, les graines sont ajoutées au milieu aqueux à raison d'une proportion inférieure à 20%, de préférence inférieure à 15%, en poids total du milieu aqueux contenant les graines.

[0023] Pour une proportion de graines supérieure à 20% en poids total du milieu aqueux, l'étape a) de broyage est difficile, voire impossible à réaliser, du fait d'une viscosité trop grande du milieu aqueux. De plus, pour une proportion des graines supérieure à 20% en poids total du milieu aqueux contenant les graines, l'étape e) de récupération des acides gras est difficile à réaliser de manière optimale, du fait d'une proportion de phase solide trop élevée.

[0024] De préférence, la proportion en poids des graines, par rapport au poids total du milieu aqueux contenant les graines, est inférieure à 15%.

[0025] En revanche, si les limites supérieures en proportion de poids des graines indiquées ci-dessus sont respectées, une cinétique optimale de la réaction d'hydrolyse et un degré d'hydrolyse d'au moins 95% des lipides sont obtenus quelle que soit la proportion en poids de graines utilisées, pour un rapport poids de lipase/poids de graines donné. Ainsi, on a montré que la cinétique d'hydrolyse et le degré d'hydrolyse des lipides contenus dans les graines était identique avec un milieu aqueux de broyage contenant respectivement 10% et 13,5 % en poids de graines, par rapport au poids total du milieu aqueux contenant les graines, pour un rapport poids de lipase/poids de graines identique.

[0026] La lipase exogène, ajoutée à l'étape b) dans la suspension hétérogène liquide/solide obtenue à la fin de l'étape a), peut être de toute nature. Elle peut être une lipase obtenue à partir de microorganismes des genres *Rhizopus*, *Mucor*, *Alcaligenes*, *Candida*, *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Thermomyces* ou encore *Penicillium* ou à partir des lipases des végétaux.

[0027] A titre illustratif, on peut utiliser la lipase obtenue à partir de *Candida rugosa*, comme décrit dans les exemples.

[0028] De préférence, la lipase exogène est ajoutée à raison de 100 à 500 unités, de préférence de 150 à 400 unités de lipase, par gramme du poids des graines traitées à l'étape a).

[0029] Une unité de lipase correspond à la quantité de lipase requise pour libérer 1 μmole d'acide gras à partir de glycérade, par minute, en conditions optimales d'activité catalytique de l'enzyme.

[0030] On a en effet montré selon l'invention qu'une bonne cinétique d'hydrolyse était obtenue avec une quantité de

lipase d'environ 100 unités par gramme de graines de départ et que le degré d'hydrolyse obtenu avec ce rapport lipase/graines atteignait environ 75% d'hydrolyse des lipides contenus initialement dans les graines.

[0031] Pour des rapports lipase/graines supérieurs, la cinétique d'hydrolyse est encore améliorée et l'hydrolyse des lipides est presque complète. Ainsi, un degré d'hydrolyse des lipides supérieur à 90% est obtenu avec un rapport lipase/graines de 166 unités de lipase par gramme de poids de graines traitées à l'étape a).

[0032] Pour des rapports encore supérieurs lipase/graines, bien que la cinétique d'hydrolyse soit accrue, le degré d'hydrolyse n'est pas significativement amélioré. Ainsi, pour un rapport lipase/graines de 333 unités de lipase par gramme du poids de graines traitées à l'étape a), un degré d'hydrolyse des lipides d'environ 95% est obtenu.

Etape d'homogénéisation de la suspension de broyat de graines contenant la lipase exogène.

[0033] A l'étape c), l'homogénéisation de la suspension liquide/solide contenant initialement des particules grossières de graines inférieures à 500 μm est réalisée jusqu'à l'obtention d'un homogénat constitué d'une émulsion des lipides contenus initialement dans les graines, en mélange avec les particules solides des graines.

[0034] L'étape c) d'homogénéisation de la suspension hétérogène liquide/solide et contenant la lipase exogène peut être réalisée par tout moyen connu en soi.

[0035] De préférence, l'étape c) d'homogénéisation est réalisée par homogénéisation sous pression ou encore par homogénéisation par sonication.

Homogénéisation sous pression

[0036] Pour réaliser l'étape c) par homogénéisation sous pression, on peut utiliser un homogénéisateur à haute pression tel que l'homogénéisateur du type Lab 1000 commercialisé par la Société APV (Evreux, France), selon les recommandations du fabricant.

[0037] De préférence, l'homogénéisation sous pression est réalisée à une pression comprise entre 25 et 1000 bars, de préférence entre 100 et 500 bars, par exemple à 150 bars.

[0038] Le saut de pression provoqué au milieu produit une onde de choc contribuant à la désintégration des cellules de la graine et disperse les lipides contenus dans la graine.

[0039] De manière tout à fait préférée, l'étape c) d'homogénéisation sera réalisée par deux cycles successifs d'homogénéisation sous pression.

[0040] De manière surprenante, l'homogénéisation sous pression n'affecte pas l'activité spécifique de la lipase exogène.

[0041] De plus, il a été observé que la réalisation de plusieurs cycles d'homogénéisation sous pression accroît le rendement final d'extraction des acides gras, même si un tel traitement inhibe faiblement l'activité de la lipase exogène.

[0042] Ainsi, bien que l'étape c) d'homogénéisation peut être effectuée par 1 à 4 cycles de passages dans un homogénéisateur à haute pression, des résultats optimaux sont obtenus avec deux cycles d'homogénéisation à haute pression. Dans ce cas, le rendement d'extraction des acides gras à la fin du procédé est accru sans affecter drastiquement l'activité de la lipase exogène.

Homogénéisation par sonication

[0043] Selon une alternative avantageuse, l'étape c) d'homogénéisation de la suspension contenant la lipase exogène peut être réalisée par sonication de ladite suspension jusqu'à l'obtention d'un homogénat constitué d'une émulsion des lipides contenus initialement dans les graines, en mélange avec les particules solides des graines.

[0044] Pour réaliser l'étape c) d'homogénéisation par sonication, la suspension particules solides à laquelle a été ajoutée la lipase exogène est traitée par des ultrasons à une puissance supérieure à 20 Watts.

[0045] La fréquence des ultrasons ne semble pas un paramètre essentiel du traitement.

[0046] Pour réaliser l'étape d'homogénéisation par sonication, on peut utiliser notamment le générateur d'ultrasons de type Vibracell commercialisé par la Société Bioblock Scientific (Illkirch, France).

[0047] On a montré selon l'invention qu'une bonne cinétique d'hydrolyse des lipides ainsi qu'un haut degré d'hydrolyse étaient obtenus avec une puissance d'ultrasons supérieure à 20 Watts. Ainsi, pour une puissance d'ultrasons de 28 Watts, le degré d'hydrolyse après 120 minutes de réaction enzymatique atteint presque 90%. Pour des puissances d'ultrasons supérieures, la cinétique d'hydrolyse des lipides est encore accrue et le degré d'hydrolyse augmente encore. Par exemple, un degré d'hydrolyse des lipides d'environ 95% est obtenu avec une puissance d'ultrasons de 82 Watts.

[0048] De préférence, on utilise une puissance d'ultrasons comprise entre 20 et 200 Watts, et de manière tout à fait préférée entre 20 et 100 Watts.

[0049] La durée de l'étape d'homogénéisation par sonication est avantageusement comprise entre 10 secondes et 10 minutes, de préférence entre 30 secondes et 5 minutes. Pour une durée de sonication de 30 secondes à la puissance

de 64 Watts, on a observé une cinétique moyenne d'hydrolyse des lipides conduisant à un degré d'hydrolyse après 120 minutes de réaction supérieur à 85%. Dans les mêmes conditions, une durée de sonication de 1 minute améliore considérablement la cinétique réactionnelle et un degré d'hydrolyse supérieur à 90% est atteint après 120 minutes de réaction.

[0050] Des durées supérieures de sonication accroissent encore la cinétique réactionnelle sans augmenter significativement le degré d'hydrolyse final.

[0051] Quelle que soit la nature de l'étape c) d'homogénéisation, par homogénéisation à haute pression ou par homogénéisation par sonication, les degrés d'hydrolyse des lipides obtenus à la fin du procédé sont comparables. Ils sont en général supérieurs à 95%, dans les conditions optimales indiquées ci-dessus.

[0052] De même, les résultats obtenus dans les exemples montrent que le rendement final d'extraction des acides gras résultant de l'hydrolyse des lipides est sensiblement le même, que l'étape c) d'homogénéisation ait été réalisée par homogénéisation sous pression ou encore par homogénéisation par sonication.

[0053] On remarque toutefois qu'une homogénéisation sous pression produit des résultats légèrement supérieurs à ceux obtenus avec une homogénéisation par sonication. Le rendement total de l'extraction des acides gras à la fin du procédé est, dans le cas d'une homogénéisation sous pression, supérieur de 6,5% au rendement observé lorsque l'étape c) d'homogénéisation a été réalisée par sonication.

[0054] L'observation au microscope de l'homogénat obtenu à l'étape c) montre que cet homogénat est formé de gouttelettes lipidiques qui s'agrègent en petits amas formant une émulsion, l'homogénat contenant en outre de nombreux débris solides des graines, notamment des débris de coque des graines ainsi que des débris cellulaires. La taille des gouttes grasses est en moyenne comprise entre 5 et 15 μm et leur surface apparaît fine et lisse, ce qui suggère que la stabilisation de l'interface huile/eau des gouttelettes ne fait pas intervenir de particules solides.

[0055] Ainsi, l'homogénat contient les lipides contenus initialement dans les graines sous la forme d'une émulsion liquide/liquide avec l'eau présente dans le milieu aqueux que constitue ledit homogénat.

Etape d'hydrolyse des lipides

[0056] L'étape d) d'hydrolyse des lipides contenus dans l'homogénat obtenu à l'étape c) est réalisée par l'incubation de l'homogénat à une température comprise entre 15°C et 55°C, pendant une durée comprise entre 15 minutes et 5 heures.

[0057] Durant cette étape, la lipase exogène catalyse la réaction d'hydrolyse des lipides, notamment des triglycérides, contenus sous la forme d'une émulsion liquide/liquide dans l'homogénat, respectivement en les différents acides gras constitutifs desdits lipides, d'une part, et des divers alcools, notamment le glycérol, avec lesquels lesdits acides gras étaient estérifiés dans les sphérosomes des graines.

[0058] Pour une température de 22°C, on observe une bonne cinétique d'hydrolyse des lipides associée à un degré d'hydrolyse supérieur à 85%. Lorsque l'on augmente la température de réaction, la cinétique d'hydrolyse des lipides s'accroît, ainsi que le degré d'hydrolyse final. Toutefois, un degré d'hydrolyse d'environ 95% est déjà obtenu après 120 minutes de réaction à la température de 27°C. A des températures supérieures, la cinétique réactionnelle augmente, alors que le degré d'hydrolyse n'est pas significativement amélioré.

[0059] Le procédé de préparation d'acides gras par hydrolyse *in situ* de l'invention peut donc être réalisé à température ambiante sans nécessiter un chauffage du milieu réactionnel constitué de l'homogénat obtenu à l'étape c), ce qui rend ce procédé simple de mise en oeuvre et en outre peu onéreux.

[0060] En outre, la possibilité de réaliser l'étape d) d'hydrolyse à basse température, par exemple entre 20°C et 30°C permet d'éviter, ou à tout le moins de réduire, l'hydrolyse simultanée d'autres composés indésirables tels que les glucosinolates, dont les produits d'hydrolyse soufrés engendrent des troubles thyroïdiens chez l'homme et l'animal. En effet, à une température égale ou inférieure à 30°C, la myrosinase, qui est l'enzyme responsable de l'hydrolyse des glucosinolates, est peu active, l'activité catalytique optimale de cette enzyme se situant entre 40°C et 70°C.

[0061] De plus, le fait qu'une bonne cinétique d'hydrolyse des lipides associée à un haut degré d'hydrolyse final soient atteints pour de larges plages de températures de l'étape d) d'hydrolyse, rend le procédé de l'invention particulièrement simple à réaliser, puisqu'aucune régulation précise de la température de réaction n'est requise.

[0062] Avantagusement, la durée de l'étape d) d'hydrolyse des lipides peut être adaptée en fonction de la température de réaction choisie. Toutefois, elle peut être réalisée de manière optimale pour une durée comprise entre 60 et 120 minutes à une température de réaction égale ou supérieure à 27°C.

[0063] Le procédé de préparation d'acides gras par hydrolyse *in situ* des lipides contenus dans les graines d'une plante ci-dessus est très reproductible. On a montré que la différence de degré d'hydrolyse entre 0 et 15 minutes de réaction varie de manière linéaire avec le rapport pondéral lipase exogène/poids des graines.

[0064] Sans vouloir être lié par une quelconque théorie, le demandeur pense que le haut niveau d'hydrolyse des lipides obtenus grâce au procédé de l'invention est due notamment à la nature spécifique de l'homogénat obtenu à l'issue de l'étape c) dudit procédé. L'étape c) d'homogénéisation permet en effet une rupture physique de la structure

macroscopique des graines et une libération dans le milieu aqueux des lipides contenus initialement dans les sphérosomes, qui sont des vésicules intracellulaires entourées d'une membrane. Le demandeur pense qu'au cours de l'étape c) d'homogénéisation, la lipase se localise sur toute la surface de l'interface huile/eau des gouttelettes lipidiques générées ce qui permet une hydrolyse rapide et aussi complète que possible desdits lipides substrats qui sont facilement accessibles à l'enzyme.

Etape de récupération des acides gras

[0065] L'étape e) de récupération des acides gras résultant de l'hydrolyse des lipides réalisés à l'étape d) peut être effectuée par toute méthode d'extraction des lipides connus de l'homme du métier.

[0066] De préférence, l'étape e) de récupération des acides gras comprend les étapes suivantes :

e1) séparation des acides gras des autres constituants de l'homogénat obtenu à l'étape d), sous la forme d'une émulsion ;

e2) extraction des acides gras à partir de l'émulsion, avec un solvant.

[0067] Selon un mode de réalisation préféré de l'étape e1), les acides gras sont séparés des autres constituants de l'homogénat obtenu à l'étape d) par obtention d'un milieu liquide à trois phases, respectivement une phase solide, une phase aqueuse et une phase d'émulsion lipidique, par centrifugation de l'homogénat, puis récupération de la phase d'émulsion lipidique. L'obtention du milieu liquide triphasique est préférentiellement réalisée par centrifugation du milieu hétérogène liquide/solide réactionnel à la fin de l'étape d) d'hydrolyse. Le cas échéant, plusieurs centrifugations successives peuvent être réalisées afin d'améliorer le rendement du procédé.

[0068] A l'issue de la ou des centrifugations, on obtient un milieu triphasique comprenant respectivement (i) un culot solide comprenant essentiellement les débris solides des graines, coques ou débris cellulaires, (ii) une phase aqueuse et (iii) une phase huileuse sous la forme d'une émulsion.

[0069] La phase huileuse sous la forme d'une émulsion constitue la phase enrichie en acides gras résultant de l'hydrolyse des lipides initialement contenus dans les graines. Cette phase huileuse représente environ 7 à 10% en poids du poids total du milieu réactionnel obtenu à la fin de l'étape d) d'hydrolyse.

[0070] La phase d'émulsion huileuse est séparée des deux autres phases respectivement aqueuses et solides, par exemple par simple prélèvement à la surface du milieu triphasique obtenu après centrifugation. Lorsque plusieurs centrifugations successives sont réalisées, les fractions d'émulsions huileuses sont réunies en vue de procéder à l'étape e2) d'extraction des acides gras avec un solvant.

[0071] De préférence, l'extraction des acides gras est réalisée avec un solvant choisi parmi l'eau, un alcool, un ester, un carbonate organique ou une cétone.

[0072] On a préférentiellement recours à l'eau pour l'extraction des acides gras sous forme d'une émulsion.

[0073] On a préférentiellement recours à l'éthanol pour l'extraction des acides gras et l'obtention de concentrats, ainsi que pour la transformation ultérieure des acides gras en esters éthyléniques, pour des applications diverses, notamment dans des solvants, des lubrifiants, des cosmétiques, des conservateurs, etc...

[0074] On a préférentiellement recours à un ester ou à un carbonate organique pour la transformation ultérieure des acides gras, *in situ* ou *ex situ*.

[0075] Le solvant précipite les protéines et les phospholipides contenus dans l'émulsion et solubilise les acides gras. La fraction de composés précipités et la fraction d'acides gras solubilisés peuvent être aisément séparées, par exemple par centrifugation.

[0076] Afin d'améliorer encore le rendement final du procédé, on procédera avantageusement à plusieurs cycles d'extraction avec le solvant, les fractions d'intérêt contenant les acides gras obtenus à la fin de chaque cycle d'extraction étant ensuite réunies.

[0077] De préférence, le solvant utilisé est l'éthanol, qui peut être par exemple ajouté à l'émulsion contenant les acides gras à raison de 1,5 à 2 volumes d'éthanol par volume d'émulsion.

[0078] L'étape e2) d'extraction des acides gras à partir de l'émulsion à l'aide d'un solvant est avantageusement suivie d'une étape e3) de séchage de la solution d'extraction contenant les acides gras.

[0079] Avantageusement, l'étape de séchage peut être réalisée par simple évaporation, à pression atmosphérique ou encore sous vide jusqu'à atteindre un séchage complet des acides gras.

[0080] Selon une autre alternative, l'étape e3) de séchage peut être une étape de séchage modéré dans lequel seul le solvant est éliminé, le milieu aqueux résiduel étant conservé.

[0081] Le cas échéant, lorsque l'étape e3) de séchage des acides gras est réalisée de la manière modérée indiquée ci-dessus, le mélange acides gras/eau peut être séparé par centrifugation. Selon ce mode de mise en oeuvre spécifique de l'étape e3) du procédé, la qualité des acides gras obtenus à la fin du procédé est la meilleure, car l'eau retient d'éventuelles impuretés tels que des peptides solubles dans l'alcool ou encore des traces de phospholipides.

[0082] La présente invention est en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures et les exemples suivants.

FIGURES

[0083]

La Figure 1 illustre la cinétique d'hydrolyse enzymatique *in situ* des lipides endogènes de la graine de colza par la lipase issue de *Candida rugosa* avec une étape d'homogénéisation réalisée par sonication.

La Figure 2 illustre les cinétiques d'hydrolyse enzymatique *in situ* des lipides endogènes de la graine de colza par la lipase issue de *Candida rugosa* : comparaison des outils de cassage cellulaire, sonication ou homogénéisation haute pression.

La Figure 3 illustre le pourcentage cumulé des lipides totaux extraits par centrifugation des milieux issus de l'hydrolyse enzymatique *in situ* de l'huile de colza, après sonication ou homogénéisation

La Figure 4 illustre les cinétiques comparatives d'hydrolyse enzymatique *in situ* des lipides endogènes de la graine de colza par la lipase issue de *Candida rugosa* (1) : effet de la teneur en matière sèche dans le milieu

La Figure 5 illustre les cinétiques comparatives d'hydrolyse enzymatique *in situ* des lipides endogènes de la graine de colza par la lipase issue de *Candida rugosa* (2) : effet de la puissance ultrasonore dissipée dans le milieu.

La Figure 6 illustre les cinétiques comparatives d'hydrolyse enzymatique *in situ* des lipides endogènes de la graine de colza par la lipase issue de *Candida rugosa* (3) : effet de la durée du traitement ultrasonore.

La Figure 7 illustre les cinétiques comparatives d'hydrolyse enzymatique *in situ* des lipides endogènes de la graine de colza par la lipase issue de *Candida rugosa* (4) : effet de la température sur la vitesse de réaction.

La Figure 8 illustre les cinétiques comparatives d'hydrolyse enzymatique *in situ* des lipides endogènes de la graine de colza par la lipase issue de *Candida rugosa* (5) : effet de la quantité de lipase introduite dans le milieu.

La Figure 9 illustre l'hydrolyse enzymatique *in situ* des lipides endogènes de la graine de colza par la lipase issue de *Candida rugosa* : effet de la quantité de lipase introduite dans le milieu sur son activité spécifique et la vitesse initiale.

La Figure 10 est un cliché photographique de microscopie photonique (grossissement x100) de l'homogénat à la fin de l'étape d'hydrolyse des lipides.

La Figure 11 est un cliché photographique de microscopie photonique (grossissement x1000) de l'homogénat à la fin de l'étape d'hydrolyse des lipides

La Figure 12 est un cliché photographique de microscopie photonique (grossissement x400) de l'homogénat à la fin de l'étape d'hydrolyse des lipides

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Homogénéisation par sonication

A. MATERIEL ET METHODES

1. Prétraitement par broyage humide

[0084] Les graines de colza sont additionnées d'eau de manière à obtenir les proportions 1 : 8 en masses, respectivement. Ce mélange est alors versé dans un mixeur ménager de type « Waring blender ». Le broyage est alors effectué pendant 5 minutes en ayant soin de ramener dans le fond du bol les particules qui adhèrent aux parois. Parallèlement, la lipase issue de *Candida rugosa* (Lipolyve, Lyven, Cagny, France) est solubilisée dans l'eau de manière à obtenir une concentration de 10 mg /ml. Quatre-vingt-dix grammes du broyat de graine précédemment obtenu sont additionnées de 10 grammes de solution enzymatique dans un bécher à double enveloppe de 150 ml. A ce stade, le milieu contient

10 % en masse de graines de colza et une quantité de lipase correspondant à 300 UL / g de graines.

2. Traitement par les ultrasons et mesure des cinétiques

[0085] Le mélange obtenu après broyage à sec ou en présence d'eau est ensuite traité par les ultrasons (Vibracell, Bioblock Scientific, Illkirch, France) 5 minutes à 59 W (70% de période active). Le milieu est refroidi pendant la sonication par circulation d'eau froide dans la paroi du bécher. Après cette étape, le courant d'eau froide est immédiatement remplacé par celui provenant d'un bain thermostaté à 37°C. On laisse alors le milieu évoluer sous agitation magnétique (250 rpm) pendant 120 minutes. Le suivi de la réaction est assuré par une série de prélèvements réalisés à des temps prédéterminés. Lors de ceux-ci, 1,5 ml de milieu sont transférés dans un tube contenant 1 ml d'acide chlorhydrique et 5 ml de chloroforme. Après agitation vigoureuse, la phase organique est prélevée, séchée avec Na₂SO₄ anhydre, puis diluée 10 fois avant d'être injectée en CPG pour analyse dans une colonne capillaire BPX5 (SGE) dimensions 12m x 0,32 mm ; épaisseur du film : 0,25 µm. Température du four: Gradient de 80°C pendant 1 min (10°C/min) 16°C jusqu'à 140°C ; 7°C/min jusqu'à 300°C ; 15°C/min jusqu'à 360°C maintenu pendant 10 min. Température du détectant 365°C.

B. RESULTATS ET DISCUSSION

[0086] Les cinétiques d'hydrolyse obtenues sont présentées sur la figure 1.

[0087] Les résultats montrent qu'une bonne cinétique d'hydrolyse des lipides est obtenue, puisque la réaction d'hydrolyse atteint un plateau après seulement 120 minutes de réaction. Le degré d'hydrolyse atteint 90%.

EXEMPLE 2 : Homogénéisation sous pression. Comparaison avec l'homogénéisation par sonication.

[0088] La présence d'amas cellulaires ne libérant pas la totalité des lipides inclus dans les cellules qu'ils contiennent nous a amené à chercher un autre outil de remplacement assurant une rupture plus complète des cellules de la graine. Déjà utilisé dans des domaines variés en agro-alimentaire, l'homogénéiseur haute pression nous est paru être une alternative envisageable. Wäsche *et al.* (1993, Wäsche A., Luck T. Holley W, 1993. « Influence of technological parameters and protein properties on the aqueous extraction and demulsification of oil from rapeseed » In Food proteins : Structure and functionality developed from the 4th Symposium on food, Schwenke K.D. (Ed.) Weinheim 198-200), ont par ailleurs décrit ce procédé comme efficace pour l'extraction aqueuse d'huile de colza. Cet outil a été choisi pour sa compatibilité avec le travail à l'échelle industrielle en plus de sa robustesse. Son principe de fonctionnement consiste à forcer le liquide à émulsionner au moyen d'une pompe à débit constant, au travers de l'espace de quelques µm laissé libre par une vanne de contre-pression. La pression en amont de cette dernière devient alors très forte, et la décompression brutale en aval de cette vanne entraîne la rupture des macrostructures telles que les cellules. La description détaillée du mode de fonctionnement de ce type d'appareil a été par ailleurs décrite en détail par Lecluse W.J. (1979, Homogénéisations à haute pression, préparation d'émulsions et de dispersions. Information Chimie 191, 1-8). Ce procédé a pour avantage d'être continu et d'obliger le traitement homogène de tout le milieu, contrairement à la sonication pour laquelle les particules ne passent dans la zone active que périodiquement.

A. MATERIEL ET METHODES

[0089] La lipase est ajoutée au milieu après broyage 5 minutes des graines en présence d'eau. L'étape de sonication est quant à elle remplacée par deux cycles d'homogénéisation par un homogénéisateur Lab 1000 (APV, Evreux, France) muni de deux étages d'homogénéisation. La pression du premier étage d'homogénéisation est réglée à 150 bars, celle du second étage étant fixée à 20 bars, en accord avec les résultats publiés par Wäsche *et al.* (1993) et avec les recommandations du fournisseur. La teneur en graine du milieu est de 13,5% en masses et le rapport lipase / graines est fixé à 333 UL / g de graines, afin de pouvoir comparer les cinétiques mesurées avec celles déjà obtenues auparavant avec l'utilisation des ultrasons. Comme lors des précédents essais, le chronomètre est déclenché à l'addition de la lipase, soit juste avant le début du passage du milieu dans l'homogénéisateur.

B. RESULTATS

[0090] La comparaison des cinétiques obtenues avec sonication ou homogénéisation, tous les autres paramètres restant par ailleurs identiques, peut être effectuée au moyen de leur représentation graphique présentée sur la figure 2.

[0091] Les deux cinétiques obtenues ont un profil similaire, mais ne sont cependant pas superposables. En effet, la courbe obtenue suite aux essais faisant intervenir l'homogénéisation montre une hydrolyse moins rapide que lors de l'utilisation des ultrasons. Cependant, il est à noter que le maximum de degré d'hydrolyse (DH) obtenu après deux heures de réaction est similaire dans les deux cas.

[0092] L'obtention d'un DH de l'ordre de 95% en 2 heures montre clairement que l'homogénéisation est capable de générer des conditions adéquates pour l'hydrolyse enzymatique *in situ* des lipides du colza. Il aurait été possible que la violence du traitement subi par le milieu dégrade la lipase, la rendant inactive. Par ailleurs, les essais de ce nouveau matériel ont été réalisés sans aucune optimisation. La vitesse d'hydrolyse mesurée ne représente donc pas *a priori* un optimum de réactivité, et la gamme de pressions d'homogénéisation possibles pour l'appareil utilisé est assez étendue. Ainsi, il est possible de faire varier la pression d'homogénéisation, mais aussi sur le nombre de passages effectués ou la pression du second étage d'homogénéisation.

Conclusion

[0093] Les premiers résultats cinétiques obtenus lors de l'hydrolyse enzymatique des lipides du colza assistée par l'homogénéisation montrent que celle-ci est possible dans ces conditions de procédé. Même si sa vitesse initiale est inférieure à celle obtenue lorsque la réaction est réalisée après sonication, le DH final reste identique.

EXEMPLE 3 : Analyse des caractéristiques physico-chimiques de l'homogénat obtenu à l'étape c) du procédé

1. Définitions et abréviations

[0094]

AG : acides gras

MG : monoglycérides

DG : diglycérides

TG : triglycérides

UL : Unité Lipase, correspondant à la quantité de lipase nécessaire pour libérer 1 μ mol. d'acide gras par minute, à partir de glycérides en conditions optimales de fonctionnement.

Inhibition : perte réversible ou irréversible d'une partie de l'activité d'une enzyme suite à un phénomène physique ou du fait d'une interaction avec une ou plusieurs molécules

US : ultrasons

CPG : chromatographie en phase gazeuse

DH : degré d'hydrolyse, défini comme étant le pourcentage de liaisons ester rompues lors de l'hydrolyse de l'huile en acides gras.

AS : Activité spécifique, définie comme la vitesse de formation des acides gras rapportée à la quantité de préparation enzymatique introduite.

2. Caractérisation de l'émulsion

2.1 Préparation d'hydrolysats et d'émulsion

Protocole de préparation de l'hydrolysats :

[0095] Un litre de milieu à 15 % en masse est préparé par passage de 5 minutes au mixer de 150g de graines de colza dans 850mL d'H₂O. Après passage au mixer, la quantité de milieu récupérée est pesée afin d'estimer la quantité de graines (15 % de la masse récupérée). L'hydrolyse est réalisée avec l'enzyme « LIPOLYVE CC » dont la concentration est 30 unités/mg.

[0096] La solution d'enzyme est préparée dans de l'eau afin d'obtenir après mélange avec le milieu une concentration d'enzyme de l'ordre de 300 unités par gramme de graines et une concentration de graines dans le milieu de l'ordre de 13.5 % en masse.

[0097] La solution d'enzyme est ajoutée au milieu et le tout est passé à l'homogénéisateur 2 cycles à 350 bars. L'homogénat (milieu passé à l'homogénéisateur) ainsi récupéré est placé dans un réacteur à 37°C avec agitation à 250 rpm durant deux heures. L'hydrolysats (homogénat après 2 heures d'hydrolyse à 37°C) est finalement conservé à 4°C.

Protocole de récupération de l'émulsion :

[0098] L'émulsion est préparée à partir de l'hydrolysats par centrifugation. Après agitation, l'hydrolysats est centrifugé 5 minutes à vitesse maximale. Lors de la dernière préparation d'émulsion, l'hydrolysats a été centrifugé 5 minutes à 7600 G. Lors de la centrifugation, les différentes phases sont séparées et il est possible de récupérer l'émulsion par filtration sur une maille fine. Le culot est ensuite remis en suspension dans la phase aqueuse avant d'être centrifugé une deuxième

fois dans les mêmes conditions. L'émulsion formée est ainsi récupérée deux autres fois.

[0099] Après trois centrifugations, seule l'émulsion est conservée et stockée à 4°C. De cette manière, il est possible de récupérer 75g d'émulsion à partir de 1000g d'hydrolysat.

2-2 Calcul de la densité de l'émulsion

[0100] Les calculs de densité ont été réalisés par pesée de volumes précis (pesée de 5mL dans une fiole jaugée). Le résultat obtenu est une moyenne de trois mesures réalisées sur des émulsions indépendantes.

Densité de l'émulsion : 0,943 \pm 0,004 g/mL

2-3 Détermination de la matière sèche

[0101] La détermination de la matière sèche permet de calculer la quantité d'eau contenue dans l'émulsion. La quantité de matière sèche est calculée par pesée d'un certain volume d'émulsion (environ 4mL) avant et après passage de 6 heures dans une étuve à 103°C. Pour éviter des pertes d'émulsion par projections, le volume d'émulsion pesé est mélangé à du sable avant d'être placé à l'étuve. Toujours pour éviter les pertes, les pesées sont effectuées avec la coupelle en aluminium contenant l'émulsion, avec le sable et avec la spatule ayant servi à mélanger le sable et l'émulsion.

[0102] La quantité restante après 6 heures à 103°C représente la matière sèche. La différence de poids nous renseigne sur la quantité d'eau contenue dans l'émulsion.

[0103] Ce test a été effectué sur trois émulsions indépendantes.

Quantité d'eau contenue dans l'émulsion : 32,5 \pm 0,6 % d'H₂O

2-4 Détermination de la teneur en acide

[0104] On attend par l'huile la quantité d'acides gras issus de l'hydrolyse des triglycérides des lipides des graines broyées.

[0105] La teneur en huile de notre émulsion est déterminée selon une "méthode simplifiée par extraction à l'hexane" (Norme V 03-908). Pour des raisons de sécurité, il a été utilisé du cyclohexane et non de l'hexane.

[0106] Cette teneur est déterminée sur la matière sèche nous ayant permis de calculer la quantité d'eau contenue dans l'émulsion. Pour éviter de fausser les résultats, la coupelle en aluminium contenant la matière sèche ainsi que la spatule ont été placées dans la cartouche du soxhlet.

[0107] Après 6 heures d'extraction à chaud, les soxhlets sont démontés et le cyclohexane évaporé sous vide.

Teneur en huile = $((m_1 - m_0) / m_{\text{essai}}) \times 100$

m_0 : tare du ballon en grammes

m_1 : masse ballon après évaporation du cyclohexane en grammes

m_{essai} : masse d'émulsion, en grammes, utilisée pour obtenir la matière sèche

Teneur en huile de l'émulsion : 58,3 \pm 1,3 %

2-5 Dosage des protéines selon la méthode Kjeldahl

[0108] Le dosage des protéines contenues dans l'émulsion se fait indirectement par dosage de l'azote selon la méthode Kjeldahl: minéralisation et distillation à la vapeur.

[0109] Le protocole suivi pour le dosage des protéines sur l'émulsion dérive de la note d'application fournie avec le système de minéralisation « TECATOR 2020 Digestor » :

- prise d'essai d'environ 300mg (pesée au mg près) placée dans tube de minéralisation
- ajout de deux « Kjeltabs CK » (Thompson & Capper LTD, Ref. AA17)

EP 1 537 194 B1

- ajout de 12mL d'H₂SO₄ 95% puis légère agitation
- fixation de la tête d'aspiration sur les tubes, aspiration maximum
- tubes introduits dans bloc de minéralisation « TECATOR 2020 Digestor » à 420°C
- au bout de 5 minutes, réglage de l'aspiration pour conserver les vapeurs acides à l'intérieur de la tête d'aspiration en ayant une position correcte de l'anneau de condensation
- minéralisation poursuivie pendant une heure pour obtenir une solution limpide de couleur bleu/vert
- après 20 minutes de refroidissement, la distillation est réalisée avec l'appareil Kjelttec 1026
- introduction dans le distillateur d'une fiole conique contenant 25mL de solution d'indicateur (acide borique 4 %, vert de bromocrésol 1x10⁻³%, rouge de méthyle 7x10⁻⁴%)
- distillation sur l'appareil Kjelttec 1026 avec les réglages suivants : Alkali 2 (3 volumes sont parfois nécessaires), Delay 2 et Steam 36
- titration du distillat avec une solution d'acide chlorhydrique 0.0136 N

[0110] Deux dosages de l'azote ont été réalisés sur chacune des trois émulsions indépendantes.

$$\% \text{ Azote} = (V_{\text{HCl essai}} - V_{\text{HCl blanc}}) \times N_{\text{HCl}} \times 14.007 \times 100 / m$$

V : volume HCl utilisé pour la titration en mL

m : masse d'échantillon d'émulsion en milligrammes

$$\% \text{ Protéines} = \% \text{ Azote} \times F$$

F : facteur de conversion de l'azote en protéines, dans notre cas 6.25

Teneur en protéines de l'émulsion : 7,24 ± 0,47 %

2-6 Dosage du phosphore contenu dans l'émulsion

[0111] Dosage colorimétrique du phosphore contenu dans l'émulsion selon la Norme NF-T 60-227 « Méthode Vanadomolybdique » :

- prise d'essai d'environ 1.2g d'émulsion placée dans un creuset
- ajout de 0.1g d'oxyde de magnésium préalablement calciné
- passage de 2 heures au four à 900°C pour obtenir des cendres blanches
- les cendres sont ensuite dissoutes dans 5mL d'HNO₃ 6N
- préparation des échantillons de la courbe étalon :

Préparation d'une solution de phosphore à 1 mg/mL dans de l'HNO₃ 6N (463mg Na₂HPO₄ dans 100mL d'HNO₃ 6N). Les différentes concentrations de la gamme sont préparées directement dans les cuves du spectrophotomètre.

Tableau 1 :

Préparation de la gamme étalon pour le dosage du phosphore					
[PO ₄ ²⁻] mg/mL	0.4	0.2	0.1	0.05	0
Vanadate 0.25% (μL)	800	800	800	800	800
Molybdate 5% (μL)	800	800	800	800	800
HNO ₃ 6N (μL)	240	320	360	380	400
H ₂ PO ₄ , HNO ₃ 6N (μL)	160	80	40	20	0

EP 1 537 194 B1

- de la même manière les échantillons sont préparés directement dans les cuves avec 400 μ L de cendres dissoutes dans l'acide, 800 μ L de Vanadate 0.25% et 800 μ L de Molybdate 5%
- après 20 minutes (formation du complexe vanadomolybdique), l'absorbance de la gamme étalon et des échantillons est mesurée à 460nm
- avec la courbe étalon, on obtient pour chaque échantillon une concentration en phosphore dans les cendres dissoutes
- la teneur en phosphore de l'émulsion est finalement calculée avec la masse d'émulsion connue

[0112] Le dosage du phosphore a été réalisé sur trois émulsions indépendantes.

$$\text{Teneur en phosphore} = ([\text{PO}_4^{2-}] \times 0.05) \times (100 / m)$$

[PO₄²⁻] : concentration en phosphore des cendres dissoutes en mg/mL

m : masse de la prise d'essai en grammes

Teneur en phosphore de l'émulsion : 0,148 \pm 0,004 %

[0113] Il est aussi possible avec ce dosage d'estimer le pourcentage en masse des phospholipides en multipliant la teneur en phosphore par un facteur 26. Nous obtenons donc ainsi :

Teneur en phospholipides de l'émulsion : 3,8 \pm 0,1 %

2-7 Caractéristiques de l'émulsion

[0114] Nous pouvons maintenant faire une synthèse des composants de l'émulsion avec leurs proportions respectives.

L'émulsion est composée de :

- ... 32,5 % d'H₂O \pm 0,6%
- 58,3 % d'huile \pm 1,3%
- 7,24 % de protéines \pm 0,47%
- 3,8 % de phospholipides \pm 0,1 %

L'émulsion a une densité de 0,943 \pm 0,004%

EXEMPLE 4: Extraction des acides gras après hydrolyse des lipides.

A. MATERIEL ET METHODES

[0115] Les milieux utilisés pour réaliser ces essais sont obtenus par homogénéisation sous pression ou par homogénéisation par sonication, comme indiqué dans les Exemples 1 et 2

L'homogénéisation par sonication a été réalisée par sonication continue à la puissance de 82 W.

[0116] Quarante grammes de milieu hydrolysé sont centrifugés 5 min à 2500 g. La phase aqueuse et l'émulsion sont transférés dans une ampoule à décanter où elles sont mélangées avec 30 ml de méthanol puis 30 ml de chloroforme.

[0117] Cette mixture est centrifugée 5 minutes, puis la phase chloroformique est prélevée, tandis que le reste est extrait une seconde fois par 30 ml de chloroforme. La masse de matière grasse ainsi extraite est pesée après évaporation sous vide du chloroforme.

[0118] Pour sa part, le culot est pesé avant d'être complété avec de l'eau distillée jusqu'à obtention de la masse initiale de milieu traité. L'ensemble est ensuite homogénéisé par agitation vigoureuse 30 secondes. Cette nouvelle suspension est alors traitée comme le milieu initial par centrifugation puis extraction de la matière grasse des phases supérieures au solvant. Au total, 4 cycles sont effectués de cette manière, le dernier culot obtenu étant lui aussi extrait par le chloroforme et le méthanol après avoir été remis en suspension dans 15 ml d'eau distillée. Un bilan sur les lipides pourra ainsi être réalisé.

[0119] Chaque essai a été réalisé à trois reprises pour déterminer l'erreur sur la valeur expérimentale

B. RESULTATS

[0120] Si l'étude cinétique de la réaction d'hydrolyse *in situ* des lipides du colza après mise en interaction des glycérides et de la lipase par homogénéisation donne une bonne idée des possibilités de ce type de procédé en terme de réactivité, l'étude de l'extractibilité des acides gras formés est primordiale. En effet, c'est surtout en vue d'améliorer le rendement d'extraction des lipides que l'homogénéisation a été testée en tant qu'outil de cassage cellulaire. Ces essais vont donc permettre de comparer l'extractibilité à l'eau des lipides suivant le type de procédé utilisé.

[0121] Le pourcentage cumulé des lipides totaux extraits après chaque cycle de lavage est présenté sur la figure 3. La comparaison des résultats obtenus pour une hydrolyse faisant intervenir la sonication ou l'homogénéisation nous montre une extractibilité des lipides identique lors du premier cycle. Cependant, le pourcentage total des lipides extraits au cours des cycles suivants est nettement plus élevé si le milieu a subi un traitement d'homogénéisation sous pression. En effet, une différence de 6,5% est observée sur le rendement total.

[0122] Cette différence montre que l'homogénéisation du milieu à haute pression libère une plus grande quantité d'acides gras sous forme d'émulsion. Ceci suggère que la rupture des parois cellulaires est plus étendue que lors des expériences faisant intervenir la sonication.

[0123] La similitude entre les rendements d'extraction lors du premier cycle de centrifugation semblerait indiquer que les interactions entre les particules de l'émulsion et les débris cellulaires sont à peu près équivalentes dans les deux cas.

Conclusion

[0124] La préparation des milieux d'hydrolyse par broyage suivi d'homogénéisation permet d'améliorer nettement le rendement total d'extraction des acides gras produits lors de la réaction. La différence mesurée après 4 cycles de lavage / centrifugation est de 6,5%. Par contre, l'extractibilité observée après le premier cycle d'extraction aqueuse laisse penser que les interactions entre les gouttelettes d'émulsion et les débris cellulaires du culot sont du même ordre dans le cas de l'utilisation des ultrasons ou de l'homogénéisation sous pression.

EXEMPLE 5 : Conditions optimales de quantités de graines dans le milieu de broyage de départ**A. MATERIEL ET METHODES.****Quantité de graines.**

[0125] La proportion de graines introduites dans le milieu conditionne directement le taux de remplissage du réacteur en substrat glycéridique. En effet, lors de l'augmentation de la teneur en graines du milieu, celui-ci est logiquement enrichi en glycérides et en protéines, qui représentent respectivement 46,5 et 18 % de la masse fraîche des graines de colza utilisées. En conséquence, on a fait varier la quantité de graines dans le milieu dans la limite des possibilités du matériel. La réponse mesurée au cours de cette étude est l'évolution du degré d'hydrolyse (DH) au cours du temps.

Procédé

[0126] Le protocole de mesure des cinétiques réactionnelles est réalisé avec utilisation du broyage humide comme étape de prétraitement avant sonication. Afin que cette dernière étape du procédé ne soit pas limitante, la sonde à ultrasons a été réglée à sa puissance maximale, soit 82 W avec une période active de 100 %. Deux teneurs en graines ont été testées : 10 et 13,5%. Au delà, la sonde à ultrasons s'échauffe, ce qui présente un risque de détérioration du matériel. Comme précédemment, chaque essai a été réalisé à trois reprises afin de s'assurer de la reproductibilité.

B. RESULTATS

[0127] Les cinétiques obtenues, présentées sur la figure 4, sont superposables, aux erreurs expérimentale près. La vitesse d'hydrolyse y est rapide pendant les 30 premières minutes, pour se ralentir ensuite progressivement jusqu'à atteindre un palier après 60 minutes de réaction, pour une valeur optimale de DH de 95%.

[0128] De toute évidence, l'efficacité de la lipase ne semble pas être affectée par cette variation de la teneur en matière sèche. Ceci semble logique car si la proportion de graines introduite dans le milieu diffère, le rapport enzyme / graine ne varie pas. Ceci signifie que ni le ratio glycérides / lipase ni la proportion de protéines par rapport à l'enzyme n'ont évolué. Ainsi, l'apport de composés potentiellement inhibiteurs est contrebalancé par l'ajout en parallèle d'une proportion identique de lipase. Le seul paramètre qui aurait pu être limitant est la quantité d'eau disponible pour que la réaction ait lieu. Les résultats expérimentaux montrent que ce n'est pas le cas.

[0129] Cependant, le type de procédé utilisé ne permet guère d'augmenter plus la quantité de graine présente dans

le milieu, car la sonde à ultrasons s'échauffe rapidement. Par ailleurs, le broyage devient impossible à réaliser dès 20% de teneur en graines pour cause de trop forte viscosité. Enfin, la décantation centrifuge n'est plus possible si la proportion de phase solide (culot) est trop élevée.

Conclusion

[0130] La réactivité ne semble pas affectée par l'augmentation de la teneur en matière sèche dans le réacteur. Cependant, la viscosité du milieu croissant rapidement avec la proportion de graines, notre matériel ne permet pas de réaliser des essais avec un milieu comportant une quantité plus élevée de graines.

EXEMPLE 6: Conditions optimales de l'homogénéisation par sonication - Puissance des ultrasons

[0131] On a montré que l'efficacité de la lipase lors de l'hydrolyse des glycérides dépend étroitement des interactions que ces deux familles de molécules parviennent à établir entre elles. Les ondes ultrasonores étant l'outil de cette mise en contact par le biais de la création d'interface, il est donc raisonnable de penser que de leur intensité va dépendre la réactivité dans le milieu.

Procédé

[0132] Un mélange contenant 15 % de graines de colza dans l'eau distillée est broyé pendant 5 minutes dans un mixeur ménager de type « Waring blender ». Parallèlement, la lipase issue de *Candida rugosa* (Lipolyve, Lyven, Cagny, France) est solubilisée dans l'eau de manière à obtenir une concentration de 10 mg / ml. Quatre-vingt-dix grammes du broyat de graine précédemment obtenu sont additionnés de 10 grammes de solution enzymatique dans un bécher à double enveloppe de 150 ml. A ce stade, le milieu contient 13,5 % en masse de graines de colza et une quantité de lipase correspondant à 333 UL / g de graines. Le mélange est ensuite traité par les ultrasons (Vibracell, Bioblock Scientific, Illkirch, France) 5 minutes à 12, 28, 47, 64 ou 82 W (100% de période active) selon les essais. Le milieu est refroidi pendant la sonication par circulation d'eau froide dans la paroi du bécher. Après cette étape, le courant d'eau froide est immédiatement remplacé par celui provenant d'un bain thermostaté à 37°C. On laisse alors le milieu évoluer sous agitation magnétique (250 rpm) pendant 120 minutes. Le suivi de la réaction est assuré par une série de prélèvements réalisés à des temps prédéterminés. Lors de ceux-ci, 1,5 ml de milieu sont transférés dans un tube contenant 1 ml d'acide chlorhydrique et 5 ml de chloroforme. Après agitation vigoureuse, la phase organique est prélevée, séchée avec Na₂SO₄ anhydre, puis diluée 10 fois avant d'être injectée en CPG pour analyse. Chaque essai a été réalisé à trois reprises pour déterminer l'erreur sur la valeur expérimentale

B. RESULTATS

[0133] L'effet de la puissance ultrasonore dissipée dans le milieu réactionnel est présenté sur la Figure 5. La superposition des courbes de cinétique d'hydrolyse en fonction du temps nous permet une comparaison des différents résultats obtenus. Il apparaît de suite sur ce graphique que plus la puissance ultrasonore utilisée est forte, plus la vitesse de réaction est élevée.

[0134] Cette observation vérifie l'importance du rôle de l'étape de sonication du milieu. En effet, elle conditionne en grande partie la réactivité, et ces essais montrent que le contrôle de la puissance ultrasonore dissipée est primordial. Nous avons vu que les ultrasons permettent de briser les parois cellulaires et ainsi de libérer les lipides que renferme la graine. Le mécanisme de cette rupture cellulaire est lié à la cavitation engendrée par les ultrasons. L'intensité de celle-ci dépendant de la puissance des ondes, acoustiques qui la génère, il semble donc logique que l'augmentation de la puissance fournie par la sonotrode se concrétise au sein du milieu par une meilleure mise en interaction des lipides et de la lipase. Il s'ensuit alors une exaltation de la réactivité, que l'on peut observer au travers de l'amélioration des cinétiques de croissance du DH lors de l'augmentation de la puissance de sonication utilisée.

[0135] Ainsi, les résultats obtenus confirment l'importance de la mise en interaction de la lipase et des lipides pour que l'hydrolyse des glycérides ait lieu de manière optimale.

Conclusion

[0136] La comparaison des cinétiques d'hydrolyse *in situ* des lipides de la graine pour différentes puissances de sonication utilisées durant la préparation du milieu nous permet de montrer une influence positive de la puissance ultrasonore utilisée. L'augmentation de celle-ci permet un meilleur cassage des cellules de la graine, ce qui améliore la mise en interactions des lipides et de la lipase. Ces résultats confirment donc l'hypothèse de travail selon laquelle la réactivité du milieu réactionnel est étroitement liée aux interactions lipides /lipase.

EXEMPLE 7 : Conditions optimales de l'homogénéisation par sonication - Durée de la sonication.

[0137] Nous venons de montrer que la puissance de sonication influe fortement sur la cinétique réactionnelle. Ce paramètre est également à coupler avec la durée de traitement ultrasonore appliqué. Dans cet exemple, on vise à déterminer l'influence du temps de sonication.

Procédé

[0138] La période de sonication a été fixée tour à tour à 30 sec., 1 min., 2 min., 3 min. et 5 min pour une puissance ultrasonore fixée à 64 W. L'évolution du DH en fonction du temps est utilisé comme réponse, chaque essai étant répété à trois reprises pour s'assurer de sa reproductibilité.

B RESULTATS

[0139] Les résultats sont présentés sur la Figure 6.

[0140] Les cinétiques obtenues lors de l'hydrolyse des lipides du colza *in situ* avec différentes durées de sonication à 64W sont représentées sur la figure 6. Les vitesses d'hydrolyse observées sont d'autant plus rapides que la durée de la période de passage du milieu aux ultrasons est longue. Cependant, les courbes obtenues pour 3 et 5 minutes de traitement du milieu par les ultrasons sont superposables, aux erreurs expérimentales près. D'après ces résultats, la durée de sonication du milieu joue donc un rôle positif jusqu'à un certain point. Pour des temps de traitement supérieurs, un plateau est atteint.

[0141] L'effet positif de la durée de sonication semble logique au vu des résultats obtenus dans le cadre des essais sur l'impact de la puissance ultrasonore dissipée dans le milieu. L'augmentation du temps de passage aux ultrasons favorise leur action. Il s'ensuit une disruption plus complète des parois cellulaires, ce qui améliore l'accessibilité de la lipase à son substrat lipidique. Autrement dit, l'augmentation de la durée de sonication favorise les interactions entre l'huile de la graine et la lipase, ce qui explique une augmentation de la réactivité. Le pallier se justifie quant à lui l'aboutissement à un maximum du processus de lyse cellulaire pour lequel la puissance sonore introduite dans le milieu devient limitante pour la poursuite de la dégradation des structures biologiques de la graine. En conséquence, on atteint un maximum de réactivité pour une puissance ultrasonore donnée.

[0142] Les résultats présentés dans l'exemple indiquent qu'une période de sonication de 3 minutes est suffisante pour mener l'hydrolyse dans des conditions optimales. Par contre, pour toute durée inférieure de traitement, la réactivité sera moindre.

Conclusion

[0143] La durée de sonication du milieu est un paramètre important, qui joue un rôle positif sur la réactivité. L'explication de ces observations est proche de celle avancée pour justifier l'influence de la puissance ultrasonore appliquée au milieu. Un maximum est observé pour une durée de traitement supérieure ou égale à 3 minutes, au delà desquelles il n'y a plus d'amélioration des interactions entre la lipase et son substrat.

EXEMPLE 8: Conditions optimales de l'étape d'hydrolyse des lipides - Température de la réaction d'hydrolyse.**A. MATERIEL ET METHODES**

[0144] La puissance ultrasonore dissipée dans le milieu est de 82 W et la température est fixée à 22, 27, 32, 37 ou 42°C. Les différentes cinétiques de DH obtenues sont comparées entre elles. Chaque essai est répété 3 fois et un écart-type est calculé.

B. RESULTATS

[0145] Les résultats obtenus pour chaque température sont représentés sur la figure 7 pour permettre une comparaison. On observe que les cinétiques obtenues pour les hydrolyses réalisées à 42°C et 37°C sont totalement superposables et semblent très légèrement supérieures à celles obtenues pour une température de 32°C ou 27°C. L'évolution du DH pour les réactions menées à 27°C est quant à elle la plus faible, mais reste malgré tout assez proche de celle observée pour les autres températures.

[0146] Ces résultats démontrent clairement qu'une réactivité correcte peut avoir lieu pour des températures inférieures à 37°C. En fait, ce paramètre paraît avoir une faible incidence sur la vitesse d'hydrolyse dans la plage de 20°C explorée. Selon toute vraisemblance, il doit être possible de réaliser l'hydrolyse des triglycérides du colza sans que celle des

glucosinolates ne se produise. En effet, une température de réaction proche, voire inférieure à 30°C paraît défavorable pour une activité optimale de la myrosinase (enzyme responsable de l'hydrolyse des glucosinolates), puisque son optimum de fonctionnement se situe entre 40 et 70°C (Maheshwari *et al.*, 1981 Maheshwari P.N., Stanley. D.W., Gray J.J., 1981, Detoxification of rapeseed products. J. Food Protection, Vd. 44(6) : 459-470). *A contrario*, la lipase montre

une activité optimale ou sub-optimale pour des températures de l'ordre de 30°C.

[0147] La capacité pour la lipase de travailler à des températures inférieures à celles utilisées jusqu'à présent présente également un intérêt au niveau de la consommation énergétique, qui peut de cette façon être diminuée. Enfin, ces essais montrent qu'une régulation très précise de la température n'est pas nécessaire, puisque la lipase assure l'hydrolyse optimale des triglycérides de la graine en acides gras sur une plage d'environ 10°C et perd peu d'activité au delà.

Conclusion

[0148] Les essais de modification de température du milieu lors de l'hydrolyse *in situ* de lipides de la graine de colza montrent que cette réaction est peu sensible à ce paramètre. Ceci nous ouvre des perspectives en terme d'élimination de la réaction parasite d'hydrolyse des glucosinolates hydrosolubles et inoffensifs pour la santé en des composés soufrés gênants par leur toxicité tant sur le plan nutritionnel que pour les catalyseurs industriels d'hydrogénation. Une réflexion plus approfondie est donc à poursuivre sur ce point. La faible sensibilité de la réaction à la température permet également une économie énergétique supplémentaire et l'absence de nécessité d'assurer une régulation fine de ce paramètre.

EXEMPLE 9: Conditions optimales de l'étape d'hydrolyse des lipides - Rapport Unités de lipase/Poids de graines de départ.

[0149] La quantité de lipase est un second facteur déterminant pour la réactivité. La détermination de ce paramètre permet ainsi de déterminer l'influence du rapport enzyme / graines sur la réactivité et sur l'efficacité de la lipase, notamment en ce qui concerne des inhibitions de l'enzyme par des composés de la graine.

A. MATERIEL ET METHODES

Procédure

[0150] Le protocole suivi est identique aux exemples précédents, avec une puissance ultrasonore fixée à 82 W, une température de 37°C. La quantité de lipase est quant à elle variable selon les essais, les différents rapports lipase / graines testés étant de 27,7, 55, 111, 222 et 333 UL / g de graines. Tout comme lors des expérimentations précédentes, chaque point a été réalisé 3 fois afin de déterminer la barre d'erreur expérimentale.

B.RESULTATS

[0151] Les cinétiques obtenues pour les différentes concentrations en lipase sont exposées sur la figure 8. On observe que la croissance du DH en fonction du temps est d'autant plus rapide que la quantité d'enzyme introduite est élevée. D'autre part aucun optimum de réactivité en fonction de la quantité de lipase ajoutée ne semble atteint.

[0152] Ces résultats confirment le rôle positif du rapport enzyme /substrat sur la réactivité.

[0153] Afin de mieux appréhender la relation entre le rapport lipase /graine et la cinétique réactionnelle, on a étudié les vitesses initiales moyennes d'hydrolyse mesurées entre 0 et 15 minutes. La différence de DH entre 0 et 15 minutes a par conséquent été calculée à partir des résultats présentés sur cette figure.

[0154] Cette réponse est bien représentative de la vitesse moyenne d'hydrolyse pendant cette période, puisque :

$$DH = \frac{[AG]}{[AG] + [MG] + 2 [DG] + 3[TG]} \times 100$$

Où :

[AG] est la concentration molaire en AG,
 [MG] est la concentration molaire en MG,
 [DG] est la concentration molaire en DG,
 [TG] est la concentration molaire en TG.

[0155] Dans la formule ci-dessus, le dénominateur représente concentration totale en radicaux acides gras, qu'il soient sous forme libre ou liée au glycérol. Cette somme reste par conséquent constante, quel que soit le DH. La différence de DH entre 0 et 15 minutes est donc égale à la quantité d'acides gras produits durant cette période, normalisée par la quantité de radicaux acide gras totaux.

[0156] Par ailleurs, on a également rapporté la vitesse initiale moyenne d'hydrolyse à la masse de poudre enzymatique introduite dans le milieu. L'activité spécifique moyenne (AS) ainsi calculée nous permettra ainsi de déceler un éventuel effet du rapport lipase /graine sur les performances de cette enzyme. Les résultats des calculs, accompagnés de leur barre d'erreur expérimentale sont présentés sur la figure 9.

[0157] La différence de DH entre 0 et 15 minutes semble varier linéairement avec le rapport lipase /graines. Un ajustement linéaire a été réalisé pour confirmer cette tendance. Le coefficient de détermination de cette droite est de 0,97, ce qui signifie une bonne linéarité des résultats. Par ailleurs, la droite d'ajustement passe par toutes les barres d'erreurs, ce qui suggère que les écarts observés entre la théorie et les valeurs expérimentales sont explicables.

[0158] La proportionnalité entre la quantité d'enzyme et la vitesse initiale de réaction nous indique que ce facteur est limitant de l'hydrolyse, pour des conditions de procédé de mise en contact données. Par ailleurs, la droite de régression passe par zéro. On ne trouve donc pas d'inhibition pour les faibles quantités de lipase.

[0159] Cette observation est par ailleurs confortée par les calculs d'activité spécifique qui indiquent que l'enzyme conserve, aux erreurs expérimentales près, une efficacité relativement constante quelle qu'en soit la concentration.

[0160] Cependant, ces données n'indiquent pas pour autant que l'efficacité de la lipase à l'interface est optimale. En effet, les résultats obtenus dans les exemples précédents montrent que les étapes de cassage des parois cellulaires jouent un rôle très important sur celle-ci. L'exemple le plus illustratif est la puissance de sonication du milieu, qui doit être optimale. Malgré la linéarité de la vitesse initiale de réaction en fonction de la quantité de lipase ajoutée, une inhibition compétitive à l'interface des lipides en émulsion reste présente.

Conclusion

[0161] Conformément à ce qui a déjà été évoqué dans la littérature ou dans les précédents rapports d'avancement, la quantité de lipase introduite a un effet positif sur la cinétique d'hydrolyse des lipides de la graine. Le calcul des vitesses initiales nous permet de montrer que cette réponse varie linéairement avec la quantité d'enzyme ajoutée au milieu, l'activité spécifique restant quant à elle relativement stable. Il en est déduit que malgré une inhibition engendrée par une compétition pour la fixation à l'interface, la quantité de lipase introduite dans le milieu est un facteur limitant de l'hydrolyse.

EXEMPLE 10 : Caractéristiques de l'homogénat.

A. MATERIEL ET METHODES

Mode opératoire

[0162] Les milieux observés sont préparés selon le même protocole que lors de l'étude de la réactivité présentée dans l'exemple précédent. Le rapport lipase/ graine est fixé à 333 UL / g de graines. Le cassage cellulaire est pour sa part assuré par un broyage humide 5 minutes suivi d'une période de 5 min. de sonication à 82 W. La proportion de graine introduite est de 13,5 % en masses. Les milieux ainsi obtenus sont laissés à réagir jusqu'à hydrolyse totale.

[0163] Une aliquote du milieu d'hydrolyse est ensuite diluée 10 fois avant d'être montée entre lame et lamelle. L'observation se fait par transmission à l'aide d'un microscope optique Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japon), muni d'oculaires grossissant 10x et d'objectifs plan fluor x10, x40 et x100 du même fournisseur. Les prises de vues sont réalisées grâce à une caméra digitale DMX 1200 (Nikon, Japon), les images étant enregistrées dans un ordinateur par le logiciel Lucia G (Nikon, Japon). Aucun retraitement de celles-ci n'a été effectué ultérieurement.

B. RESULTATS

[0164] Trois grossissements ont été utilisés pour la réalisation des clichés. Une vue d'ensemble a tout d'abord été prise. La Figure 10 illustre les différents constituants du milieu ainsi que son organisation après broyage et hydrolyse. C'est au sein de celle-ci que la lipase évolue et réagit avec les lipides de la graine.

[0165] Sur la Figure 10, on peut déjà distinguer les différentes structures observées macroscopiquement lors de la centrifugation du milieu. Les lipides situés au premier plan sont nets, tandis que les plus grosses particules qui reposent sur la lamelle après décantation sont plus floues. Sur la figure 10, les débris de coque très importants en taille sont notamment présents. Leurs dimensions sont de l'ordre de 100 à 200 µm. Etant donné leur faible épaisseur, il n'est quasiment jamais possible de les voir autrement que de face. Les restes des cellules lysées sont également visibles.

Si certaines de celles-ci, telles celles situées en haut de la figure 10, sont totalement vides, d'autres semblent en revanche moins affectées par les différents traitements de cassage subis. C'est le cas de l'amas cellulaire sombre localisé en bas de la figure 9. Les acides gras en émulsion sont également visible au premier plan.

[0166] Sur la figure 10, les acides gras apparaissent sous la forme d'une granulation présente sur toute la surface observée. On remarque que les gouttelettes lipidiques ne semblent pas se disperser mais plutôt s'agréger en petits amas. Ce phénomène est important pour l'efficacité de l'étape d'extraction car il indique que les tensioactifs de toutes natures qui garnissent les globules gras ne créent pas de répulsion entre ces derniers. En cas de difficultés pour la rupture de l'émulsion, seule la rigidité de l'interface peut être mise en cause.

[0167] Une meilleure vision de l'émulsion est possible à plus fort grossissement. C'est ce type de vue qui est montrée dans la figure 11. Cette photographie a été prise à partir de la couche grasse séparée par centrifugation, à un grossissement total de 1 000x. Cette illustration permet d'observer plus précisément les gouttelettes lipidiques. Une barre d'échelle fournit une référence pour la taille de ces gouttes grasses. Leurs dimensions sont comprises entre 5 et 15 μm . Leur surface apparaît fine et lisse, ce qui suggère que la stabilisation de l'interface est moléculaire, et ne fait pas intervenir de particule solide. Ainsi, cette observation microscopique montre que l'hydrolyse *in situ* se déroule au niveau d'un système émulsionné liquide /liquide.

[0168] Par ailleurs, la photo de la Figure 11 met en évidence que la centrifugation du milieu permet une bonne séparation des lipides et des débris cellulaires issus du cassage de la graine. Par ailleurs, la tendance déjà observée à plus faible grossissement qu'ont les gouttelettes à s'associer pour former des agrégats est confirmée par cette prise de vue plus fine.

[0169] Enfin, au vu de la taille des globules gras observés, comprise globalement entre 5 et 15 μm , il est vraisemblable qu'un début de coalescence ait déjà eu lieu. En effet, d'après Wäsche *et al.* (1993), (Wäsche A., Luck T., Holley W., 1993. Influence of technological parameters and protein properties on the aqueous extraction and demulsification of oil from rapeseed, In Food proteins : Structure and functionality developed from the 4th Symposium on food, Schwenke K.D. (c.f.) Weinheim 198-200), la taille des oléosomes de la graine de colza est comprise entre 0,5 et 1,5 μm , soit 10 fois moindre que celle observée ici. Cette coalescence peut résulter soit de la fusion de globules gras durant le traitement de cassage des structures cellulaires natives, soit d'une instabilité naturelle de l'émulsion formée. La première hypothèse semble cependant la plus vraisemblable, car aucune évolution visible de la taille des globules gras ne semble avoir eu lieu durant la centrifugation.

[0170] La figure 12 est un cliché photographique pris à un grossissement intermédiaire de 400 \times , montre le détail d'un groupe de cellules ayant subi le procédé d'hydrolyse. Sur cette photographie, il est possible de distinguer nettement des cellules entièrement vidées de leur contenu, mais aussi des cellules renfermant encore une partie de leurs constituants.

[0171] Sur la figure 12, on observe qu'une homogénéisation par sonication aboutit à la perforation des parois cellulaires, sans casser complètement la cellule puisqu'un grand nombre de cellules sont vidées sans pour autant que leurs parois n'apparaissent endommagées à ce grossissement.

Conclusion

[0172] L'observation microscopique des milieux réactionnels est riche en enseignements. Elle permet ainsi de visualiser le milieu dans lequel évolue la lipase lors de la réaction. Les photomicrographies présentées dans les figures 10 à 12 nous permettent notamment de localiser les lipides et de mieux appréhender les interactions qui ont lieu à leur surface. Ainsi, on sait désormais que la stabilisation de l'interface lipides / eau ne fait pas intervenir de particules solides, l'hydrolyse des glycérides ayant par conséquent lieu au sein d'un système liquide /liquide. Par ailleurs, les globules gras ne paraissent pas se repousser, ce qui facilite l'extraction des acides gras. Au niveau cellulaire, les observations réalisées confirment que le broyage des graines les casse relativement grossièrement, tandis que la sonication agit plus finement en perforant les parois cellulaires sans en modifier la structure de masse.

Revendications

1. Procédé de préparation d'acides gras par hydrolyse *in situ* des lipides contenus dans les graines d'une plante, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) broyage des graines en milieu aqueux jusqu'à l'obtention d'une suspension de particules solides d'un diamètre inférieur à 500 μm ;
- b) ajout d'une lipase exogène dans la suspension obtenue à l'étape a) ;
- c) homogénéisation de la suspension contenant la lipase jusqu'à l'obtention d'un homogénat constitué d'une émulsion des lipides contenus initialement dans les graines, en mélange avec les particules solides des graines ;

EP 1 537 194 B1

d) hydrolyse des lipides contenus dans l'homogénat obtenu à l'étape c) à une température comprise entre 15°C et 55°C, pendant une durée comprise entre 15 minutes et 5 heures ;

e) récupération des acides gras résultant de l'hydrolyse des lipides réalisée à l'étape d).

- 5 **2.** Procédé selon la revendication 1, **caractérisé en ce qu'**à l'étape a), les graines sont ajoutées au milieu aqueux à raison d'une proportion inférieure à 20%, de préférence inférieure à 15%, en poids total du milieu aqueux contenant les graines.
- 10 **3.** Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, **caractérisé en ce qu'**à l'étape b), la lipase est ajoutée à raison de 100 à 500 Unités, de préférence de 150 à 400 Unités de lipase par gramme du poids des graines traitées* - à l'étape a).
- 4.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, **caractérisé en ce que** l'étape c) d'homogénéisation est réalisée par homogénéisation sous pression ou par homogénéisation par sonication.
- 15 **5.** Procédé selon la revendication 4, **caractérisé en ce que** l'homogénéisation sous pression est réalisée par un ou plusieurs cycles d'homogénéisation à une pression comprise entre 25 et 1000 bars, de préférence entre 100 et 500 bars.
- 20 **6.** Procédé selon la revendication 5, **caractérisé en ce que** l'homogénéisation sous pression est réalisée par deux cycles d'homogénéisation à haute pression.
- 7.** Procédé selon la revendication 4, **caractérisé en ce que** l'homogénéisation par sonication est réalisée à une puissance d'ultrasons supérieure à 20 Watts.
- 25 **8.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, **caractérisé en ce que** l'étape e) de récupération des acides gras comprend les étapes suivantes :
- e1) séparation des acides gras des autres constituants de l'homogénat obtenu à l'étape d), sous la forme d'une émulsion ;
- 30 e2) extraction des acides gras à partir de l'émulsion avec un solvant.
- 9.** Procédé selon la revendication 8, **caractérisé en ce qu'**à l'étape e1), les acides gras sont séparés des autres constituants de l'homogénat obtenu à l'étape d) par obtention d'un milieu liquide à trois phases, respectivement une phase solide, une phase aqueuse et une phase d'émulsion lipidique, par centrifugation de l'homogénat, puis récupération de la phase d'émulsion lipidique.
- 35 **10.** Procédé selon la revendication 8, **caractérisé en ce qu'**à l'étape e2) les acides gras sont extraits par l'eau ou par un solvant choisi parmi un alcool, un ester, un carbonate organique, une cétone.
- 40 **11.** Procédé selon l'une des revendications 8 à 10, **caractérisé en ce que** l'étape e2) d'extraction des acides gras est suivie d'une étape e3) de séchage de la solution contenant les acides gras.

Claims

- 45 **1.** A method for prepaying fatty acids by hydrolyzing *in situ* the lipids contained in plant seeds, **characterized in that** it comprises the following steps of :
- 50 a) crushing seeds in a aqueous medium until a suspension of soli particles is obtained, which diameter is less than 50 μm ;
- b) adding an exogenous lipase to the suspension obtained in step a);
- c) homogenizing the lipase-containing suspension until a homogenate is obtained, which comprises the lipids initially contained in the seeds, in admixture with the see soli particles;
- 55 d) hydrolyzing the lipids contained within the homogenate obtained in step c) at a temperature ranging from 15 °C to 55 °C for a time period between 15 minutes an 5 hours;
- e) recovering the fat acids resulting from the lipid hydrolysis of step d).
- 2.** A method according to claim 1, wherein in step a), the seeds are added to the aqueous medium in an amount which

is lower than 20%, preferably lower than 15% by weight of the seed-containing aqueous medium total weight.

3. A method according to claim 1 or 2, wherein in step b), the lipase is added in an amount ranging from 1 to 500 units, preferably from 150 to 400 units of lipase per gram of the treated seeds of step a).
4. A method according to any one of claims 1 to 3, wherein the homogenization step c) is carried out through pressure homogenization or through ultrasonic homogenization.
5. A method according to claim 4, wherein pressure homogenization is carried out through one or more homogenization cycles under a pressure within the 25 to 1000 bar range, preferably within the 100 to 500 bar range.
6. A method according to claim 5, wherein pressure homogenization is carried out through two high-pressure homogenization cycles.
7. A method according to claim 4, wherein ultrasonic homogenization is conducted at a power level higher than 20 Watts.
8. A method according to any one of claims 1 to 7, wherein step e) of fatty acid recovery includes the following steps of :
 - e1) separating the fatty acids from the other components belonging to the homogenate resulting from step d), as an emulsion;
 - e2) extracting said fatty acids from the emulsion with a solvent.
9. A method according to claim 8, wherein in step e1), the fatty acids are separated from the other components belonging to the homogenate resulting from step d), by forming a three-phase aqueous medium, respectively of a solid phase, a water phase and a fat emulsion-based phase, by centrifuging said homogenate, thereafter by recovering the fat emulsion phase.
10. A method according to claim 8, wherein in step e2), the fatty acids are extracted with water or with a solvent selected within the group consisting of alcohols, esters, organic carbonates and ketones.
11. A method according to any one of claims 8 to 10, wherein step e2) of extracting the fatty acids is followed with a step e3) of drying the fatty acid-containing solution.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Fettsäuren durch in-situ-Hydrolyse der in den Samen einer Pflanze enthaltenen Lipide, **dadurch gekennzeichnet, dass** es die folgenden Schritte umfasst:
 - a) Mahlen der Samen in wässrigem Medium, bis man eine Suspension von festen Teilchen mit einem Durchmesser von unter 500 µm erhält;
 - b) Zufügen einer exogenen Lipase zu der in Schritt a) erhaltenen Suspension;
 - c) Homogenisierung der die Lipase enthaltenden Suspension, bis man ein Homogenisat erhält, das aus einer Emulsion der anfangs in den Samen enthaltenen Lipide im Gemisch mit den festen Teilchen der Samen erhält;
 - d) Hydrolyse der in dem in Schritt c) erhaltenen Homogenisat enthaltenen Lipide bei einer Temperatur zwischen 15 °C und 55 °C während einer Zeit zwischen 15 Minuten und 5 Stunden;
 - e) Gewinnung der Fettsäuren, die sich aus der in Schritt d) durchgeführten Hydrolyse der Lipide ergeben.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Samen in Schritt a) in einem Anteil von weniger als 20%, vorzugsweise weniger als 15%, bezogen auf das Gesamtgewicht des die Samen enthaltenden wässrigen Mediums, zu dem wässrigen Medium gegeben werden.
3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Lipase in Schritt b) in einer Menge von 100 bis 500 Einheiten, vorzugsweise 150 bis 400 Einheiten, Lipase pro Gramm Gewicht der in Schritt a) behandelten Samen hinzugefügt wird.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Homogenisierungsschritt c) durch Druckhomogenisierung oder durch Ultraschallhomogenisierung durchgeführt wird.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Druckhomogenisierung durch einen oder mehrere Homogenisierungszyklen unter einem Druck zwischen 25 und 1000 bar, vorzugsweise zwischen 100 und 500 bar, durchgeführt wird.

5 6. Verfahren gemäß Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Druckhomogenisierung durch zwei Homogenisierungszyklen unter hohem Druck durchgeführt wird.

7. Verfahren gemäß Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Ultraschallhomogenisierung mit einer Ultraschalleistung von über 20 Watt durchgeführt wird.

10 8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Fettsäuregewinnungsschritt e) die folgenden Schritte umfasst:

15 e1) Trennung der Fettsäuren von den anderen Bestandteilen des in Schritt d) erhaltenen Homogenisats in Form einer Emulsion;

e2) Extraktion der Fettsäuren aus der Emulsion mit einem Lösungsmittel.

20 9. Verfahren gemäß Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Fettsäuren in Schritt e1) dadurch von den anderen Bestandteilen des in Schritt d) erhaltenen Homogenisats getrennt werden, dass man durch Zentrifugation des Homogenisats ein flüssiges Medium mit drei Phasen erhält, nämlich einer festen Phase, einer wässrigen Phase und einer Lipidemulsionsphase, und die Lipidemulsionsphase gewinnt.

25 10. Verfahren gemäß Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Fettsäuren in Schritt e2) durch Wasser oder durch ein Lösungsmittel, das aus einem Alkohol, einem Ester, einem organischen Carbonat und einem Keton ausgewählt ist, extrahiert werden.

30 11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** auf den Fettsäureextraktionsschritt e2) ein Schritt e3) der Trocknung der die Fettsäuren enthaltenden Lösung folgt.

35

40

45

50

55

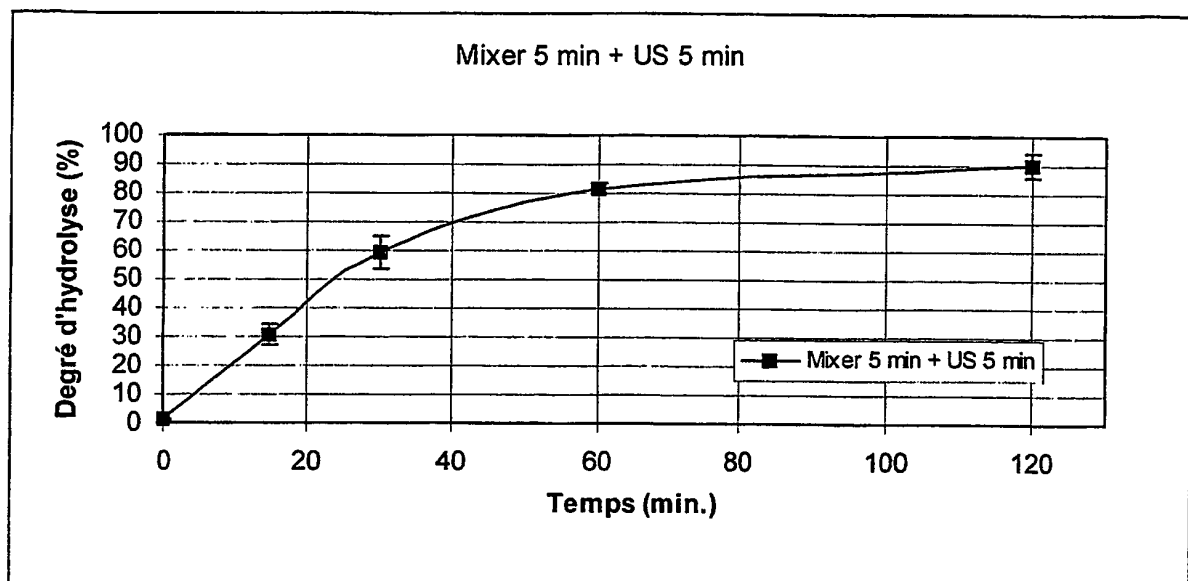
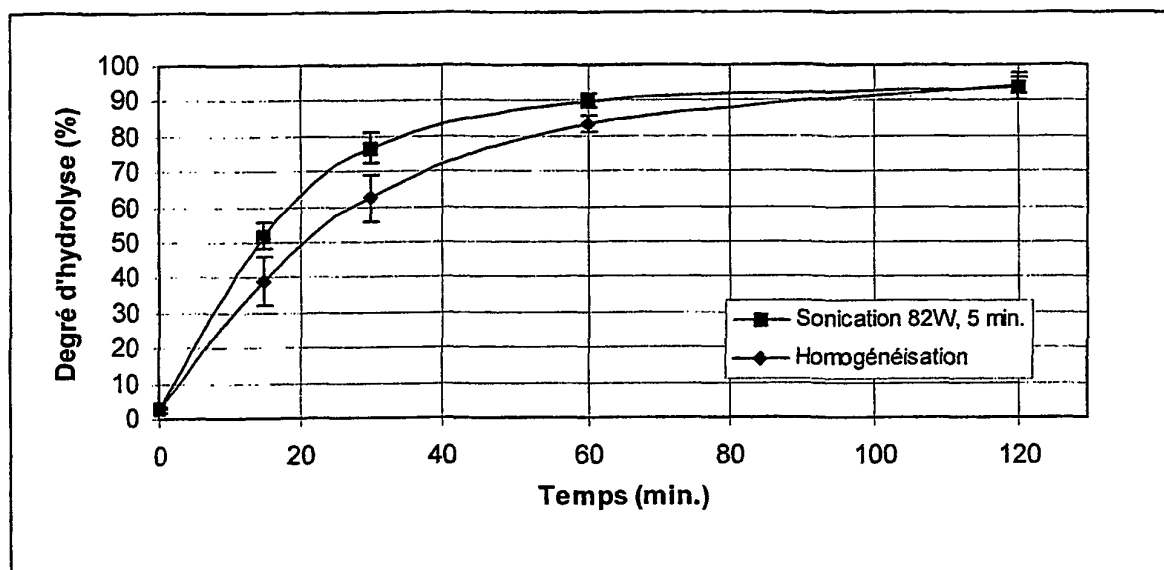


Figure 1

**Figure 2**

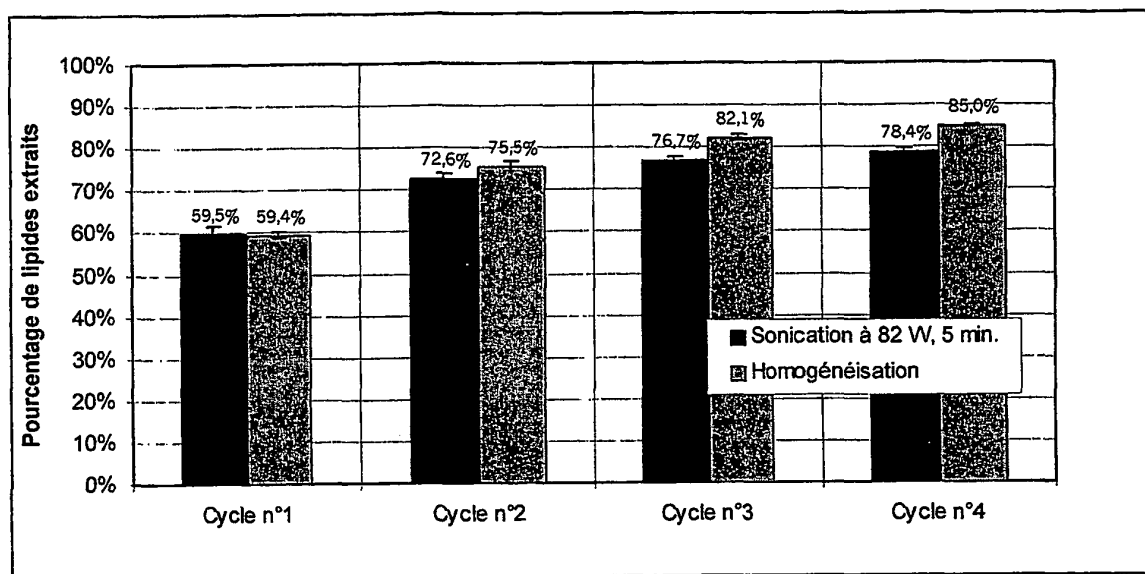


Figure 3

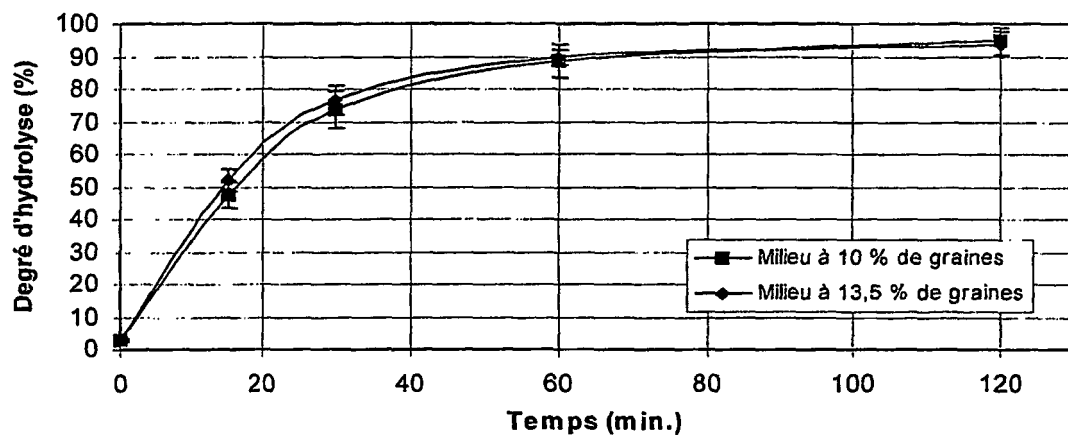


Figure 4

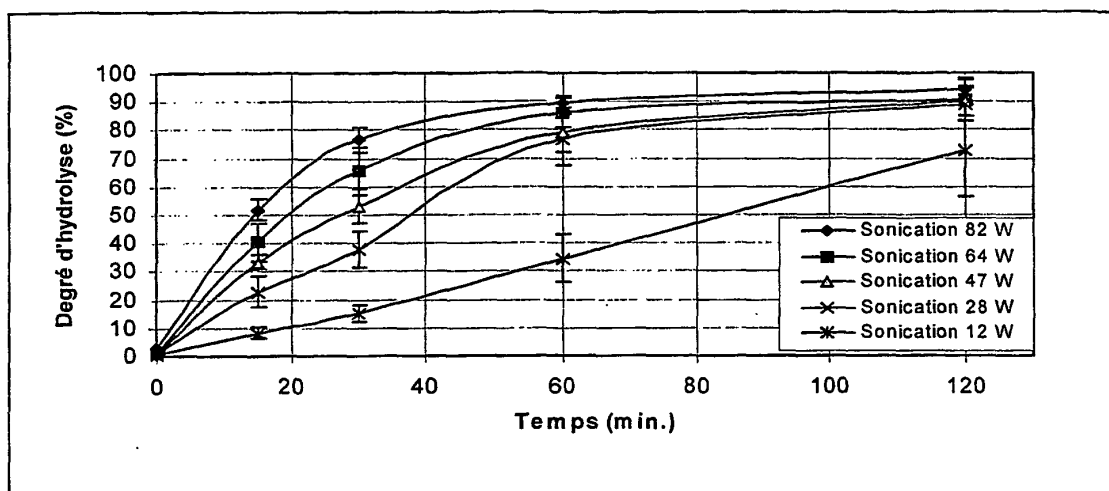


Figure 5

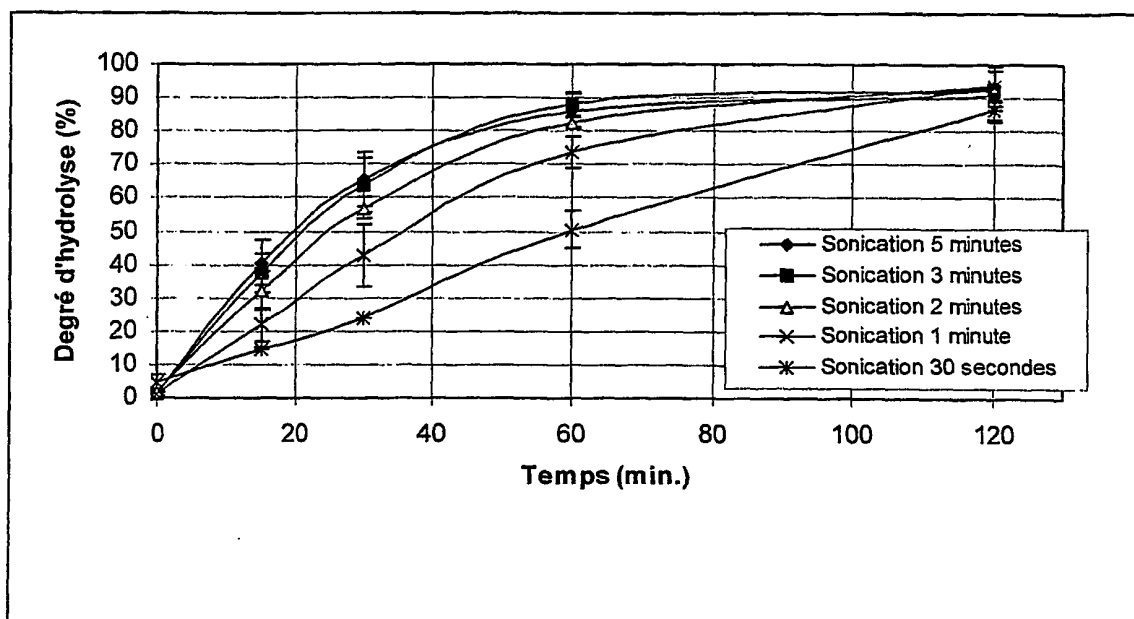


Figure 6

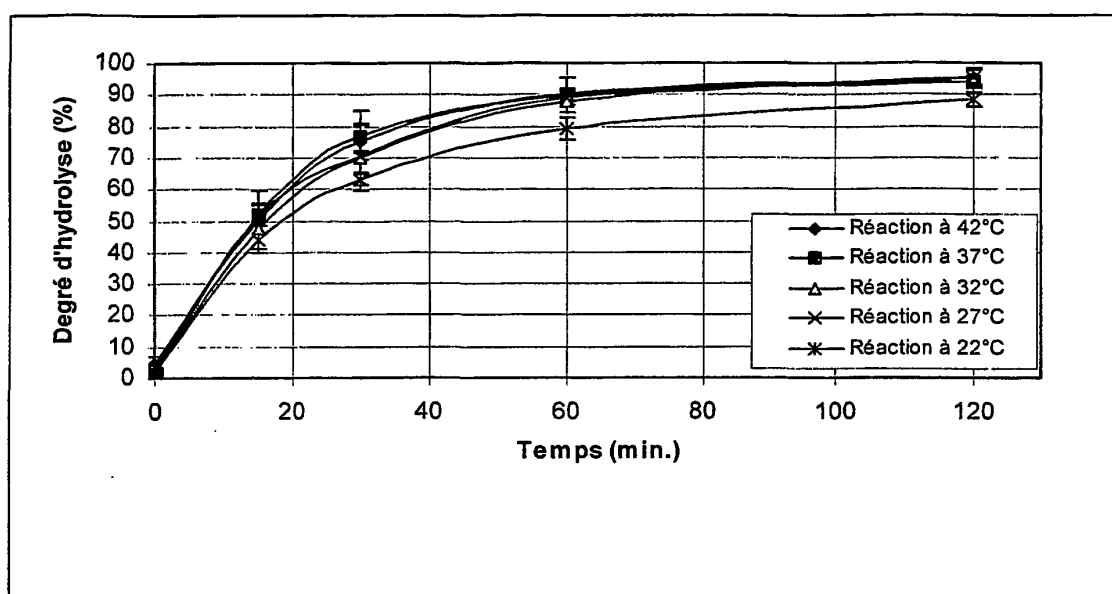


Figure 7

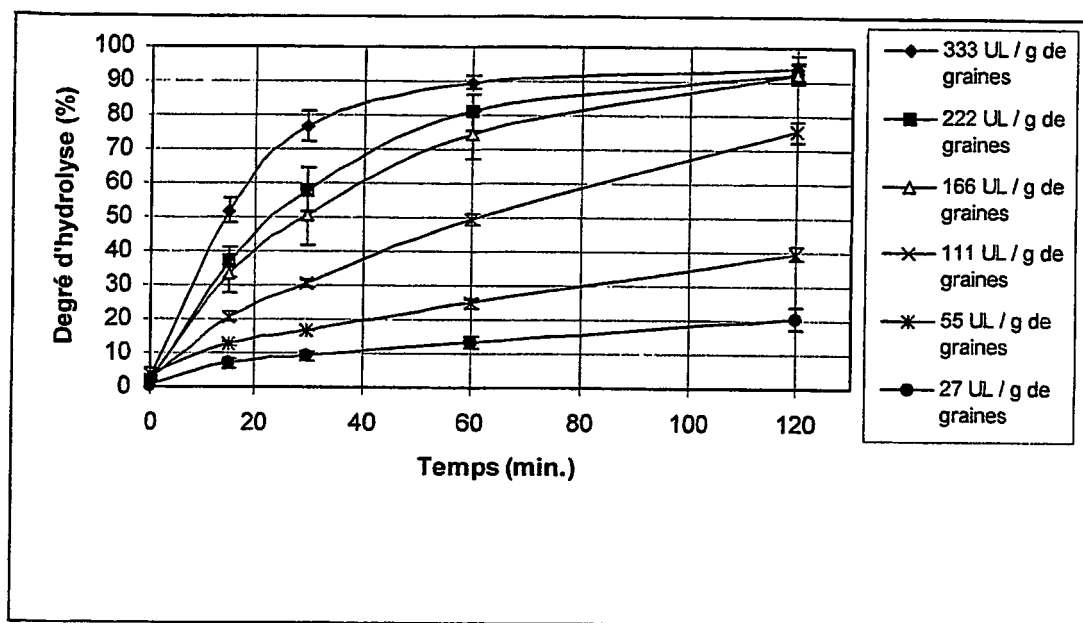


Figure 8

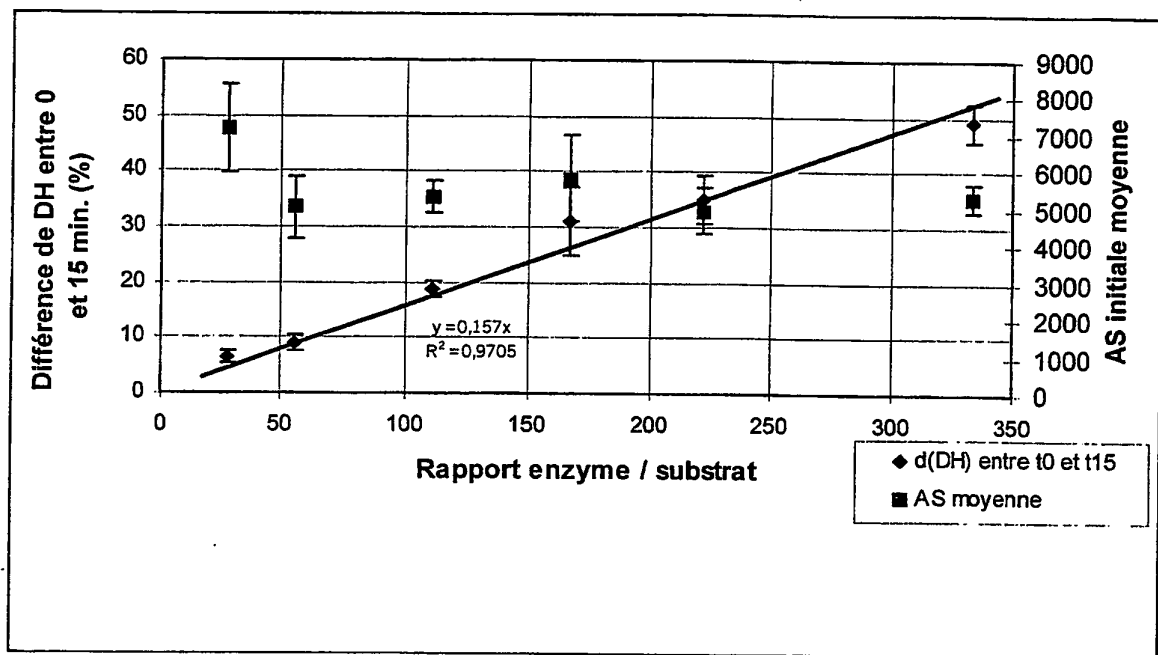


Figure 9

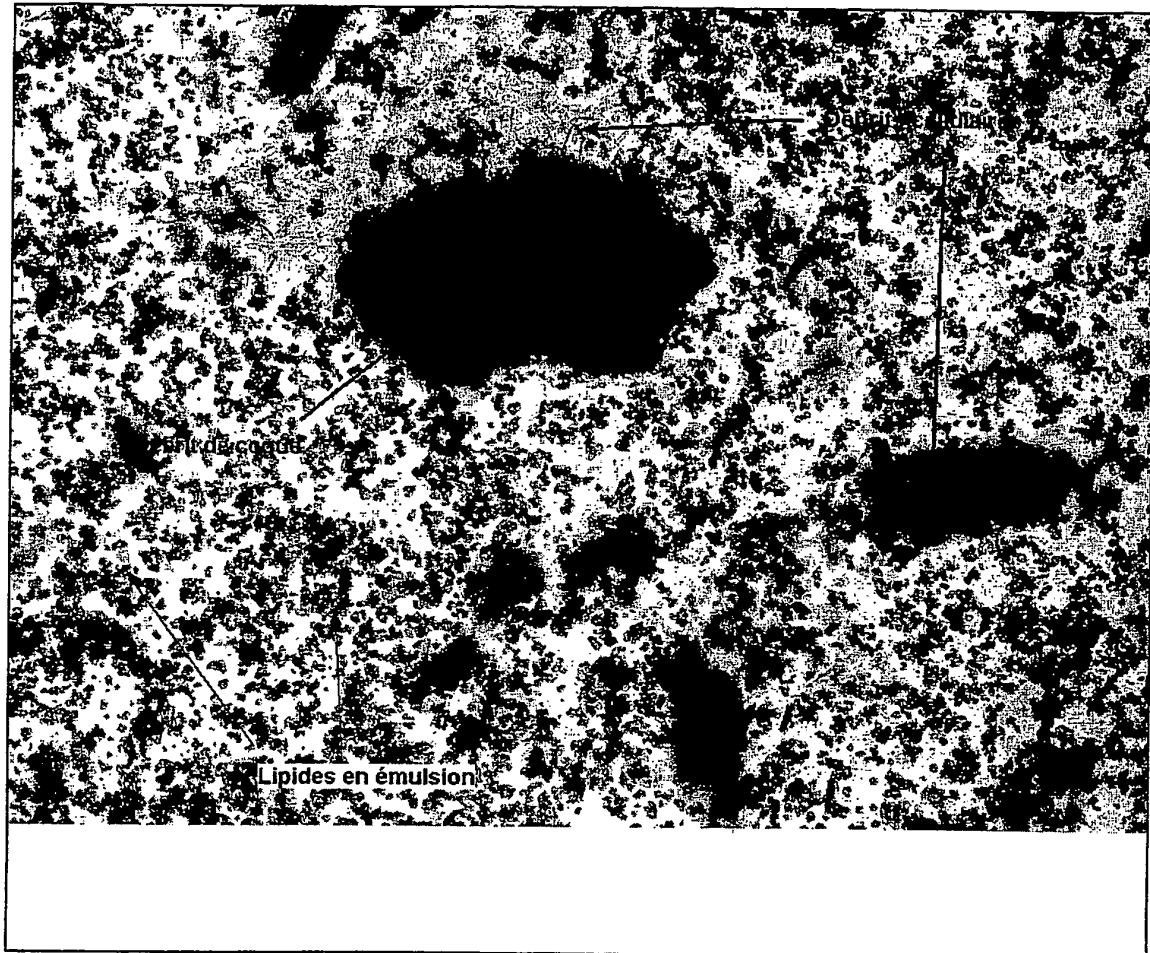


Figure 10

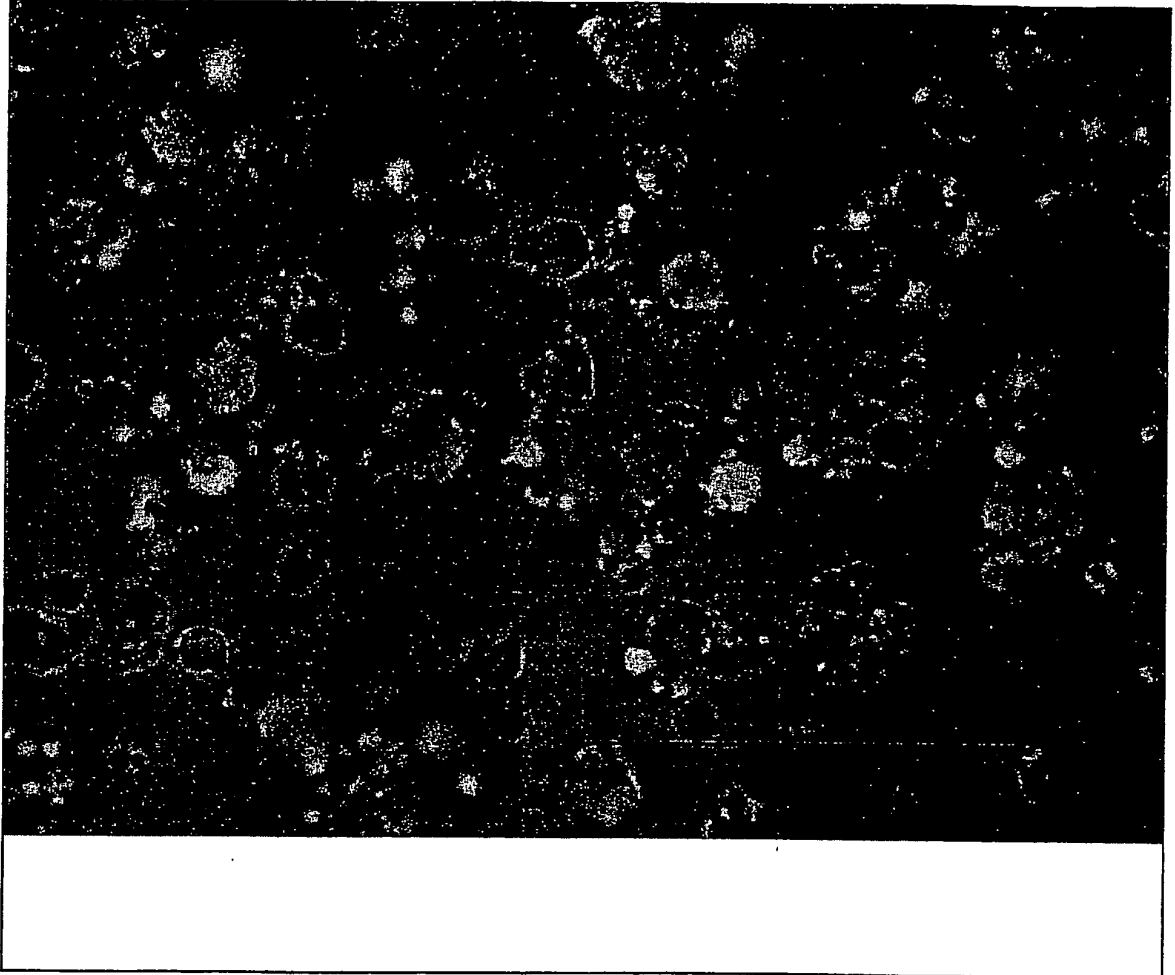


Figure 11

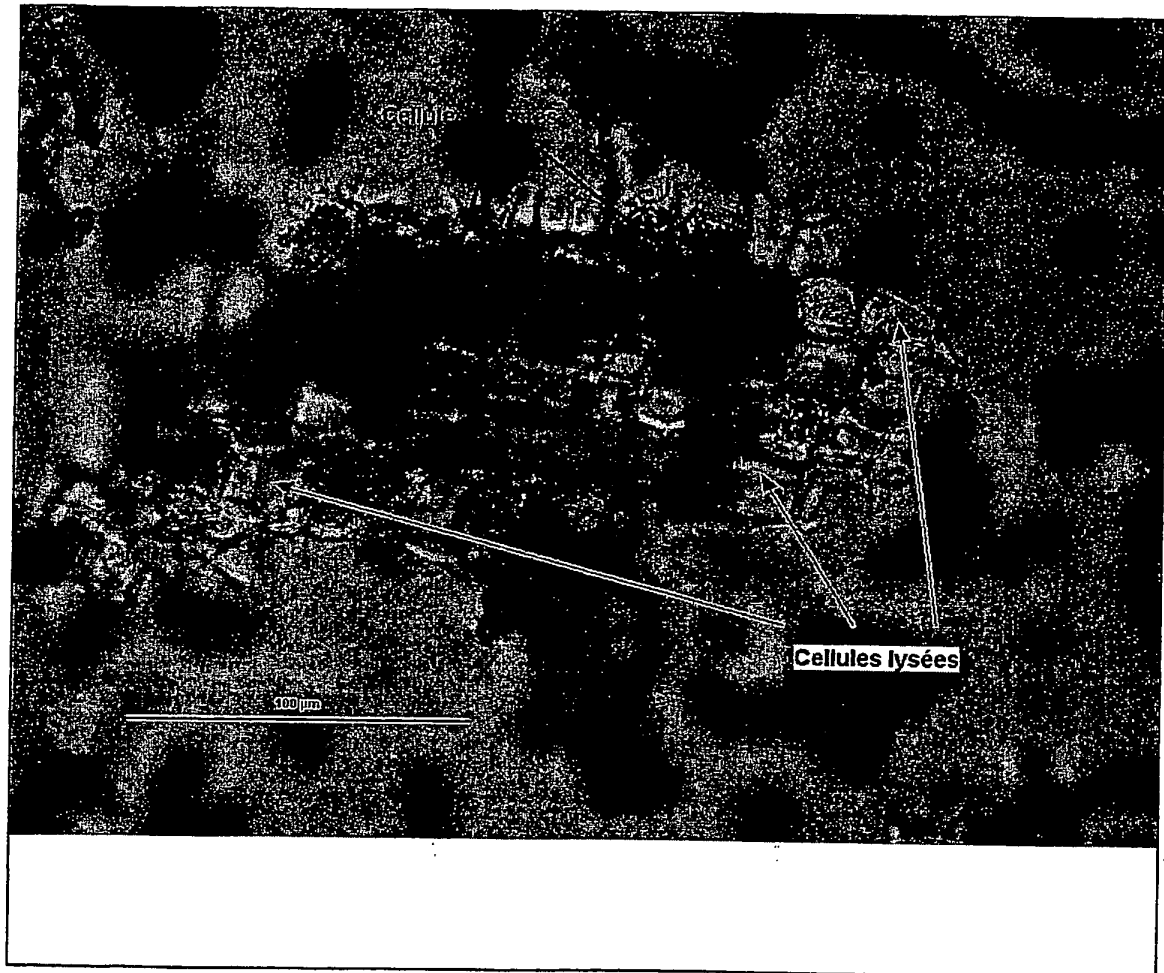


Figure 12

RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

Cette liste de références citées par le demandeur vise uniquement à aider le lecteur et ne fait pas partie du document de brevet européen. Même si le plus grand soin a été accordé à sa conception, des erreurs ou des omissions ne peuvent être exclues et l'OEB décline toute responsabilité à cet égard.

Documents brevets cités dans la description

- US 5932458 A [0007]
- US 3640725 A [0009]

Littérature non-brevet citée dans la description

- **LINFIELD W M et al.** *J. AM. Oil Chem. Soc.*, 1984, vol. 61, 1067-1071 [0005]
- **PARK Y K et al.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1988, vol. 61, 252-254 [0006]
- **RAO KSVA et al.** *Res. Ind.*, 1992, vol. 37, 36 [0008]
- **JACHMANIAN I et al.** *J Agric. Food Chem.*, 1995, vol. 43 (11), 2992-2996 [0008]
- **WÄSCHE A. ; LUCK T. ; HOLLEY W.** Influence of technological parameters and protein properties on the aqueous extraction and demulsification of oil from rapeseed. *Food proteins : Structure and functionality developed from the 4th Symposium on food*, 1993, 198-200 [0088]
- **LECLUSE W.J.** Homogénéisations à haute pression, préparation d'émulsions et de dispersions. *Information Chimie*, 1979, vol. 191, 1-8 [0088]
- **MAHESHWARI P.N. ; STANLEY. D.W. ; GRAY J.J.** Detoxification of rapeseed products. *J. Food Protection*, 1981, vol. 44 (6), 459-470 [0146]
- **WÄSCHE A. ; LUCK T. ; HOLLEY W.** Influence of technological parameters and protein properties on the aqueous extraction and demulsification of oil from rapeseed. *Food proteins : Structure and functionality developed from the 4th Symposium on food*, 1993, 198-200 [0169]