



HAL
open science

Extraction aqueuse d'huile de colza assistée par hydrolyse enzymatique : optimisation de la réaction, caractérisation de l'émulsion et étude de procédés de déstabilisation

Sandrine Guillemain

► **To cite this version:**

Sandrine Guillemain. Extraction aqueuse d'huile de colza assistée par hydrolyse enzymatique : optimisation de la réaction, caractérisation de l'émulsion et étude de procédés de déstabilisation. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006. Français. NNT : 2006INPL073N . tel-01752769

HAL Id: tel-01752769

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752769>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Onidol

Mémoire de Thèse

présenté à l'Institut National Polytechnique de Lorraine
en vue de l'obtention du grade de Docteur de L'INPL.

Spécialité : Procédés biotechnologiques et alimentaires

Présenté par Sandrine Guillemain

le 08 Novembre 2006

**Extraction aqueuse d'huile de colza assistée par hydrolyse
enzymatique :
optimisation de la réaction, caractérisation de l'émulsion et étude de
procédés de déstabilisation.**

Rapporteurs :

Dr Michel PINA, Directeur de Recherche, HDR, CIRAD, Montpellier
Dr Luc RIGAL, Ingénieur de Recherche, HDR, ENSIACET, Toulouse

Examineurs :

Georges VERMEERSCH, Directeur Recherche et développement, SOFIPROTEOL, Paris
Michel PARMENTIER, Professeur, Directeur de thèse, ENSAIA-INPL, Nancy
Jacques FANNI, Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy
Michel LINDER, Maître de Conférences, HDR, Co-directeur de thèse, ENSAIA-INPL, Nancy

Invités :

Sylvain CLAUDE, Ingénieur de recherche, ONIDOL, Paris
Lionel MUNIGLIA, Maître de Conférences, ENSAIA-INPL, Nancy

**A mes parents et à ma sœur,
A mes familles...**

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Science et Génie alimentaires de L'ENSAIA, j'adresse donc mes sincères remerciements aux Professeurs Joël Hardy et Stéphane Désobry pour m'avoir permis d'effectuer ce travail au sein de leur laboratoire et à L'ONIDOL pour son soutien financier dans le cadre de ces travaux.

Je tiens aussi à remercier,

Monsieur Michel Parmentier, Professeur à l'ENSAIA, directeur de cette thèse, pour sa haute disponibilité malgré un emploi du temps ministériel, son soutien sans faille tout au long de cette thèse et l'esprit d'équipe qu'il a si bien insufflé.

Monsieur Michel Linder, Maître de conférences à l'ENSAIA, co-directeur de thèse, pour sa présence et tous les conseils qu'il a pu me dispenser au cours de nos nombreuses discussions.

Monsieur Jacques Fanni, Professeur ENSAIA, pour les réunions « Brain storming », ainsi que pour avoir accepté de prendre part à ce Jury.

Messieurs Michel Pina, Directeur de Recherche au Cirad de Montpellier et Luc Rigal, Ingénieur de Recherche à l'ENSIACET de Toulouse, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Monsieur Georges Vermeersch, Directeur Recherche et Développement SOFIPROTEOL pour avoir accepté de prendre part à ce jury.

Messieurs Lionel Muniglia, Maître de conférences ENSAIA et Sylvain Claude, Ingénieur de Recherche ONIDOL/SOFIPROTEOL, pour avoir accepté notre invitation.

Monsieur Jaafar Ghanbaja et Madame Chanel pour leur disponibilité concernant les travaux en microscopie électronique à transmission (Service Commun de Microscopie, UHP Nancy I) et Monsieur Christophe Barvian, (LEMTA, ENSG) pour les tests effectués en diffusion de la lumière en milieu turbide.

Parce que l'ambiance du laboratoire a fortement participé à la qualité de vie que j'ai eu pendant ces quatre années, je tiens également à remercier l'ensemble des membres permanents et des thésards ou stagiaires du laboratoire, plus particulièrement :

« The technical dream team » composée de Marie-Noelle Maucourt, Mam'Caroll et Fanny. Un grand merci pour votre assistance de tous les moments et votre présence. Que vos chants rythment encore longtemps, par leurs tics et leurs tacs, l'ambiance joyeuse du laboratoire.

Angèle Colas et Anne Chassard, les plaques tournantes du laboratoire sans qui rien n'est possible. Merci encore pour votre disponibilité et votre sens de l'humanité.

Christian Sanchez qui a su au cours de mon DEA m'ouvrir les portes de la coacervation complexe et de sa vision passionnée de la Science.

L'équipe des vieux : Benjamin, Ghozlène, Marie, Olivier et Valérie qui ont su dès le départ prendre sous leurs ailes les deux nouvelles du duo « grasses power »,

La « Young thésards connection » qui a su rendre ce temps passé au laboratoire le plus doux possible :

Albarin, dit Al, le troisième gras ou « comment dompter l'odeur du fish qui réside ici bas », Ali ou la gentillesse même venue d'ailleurs , Angélica ou l'épice dans tout ses états, Athman ou l'homme aux senteurs paradisiaques, Charbel ou le cuisinier de rêve aux saveurs irréelles, Claire ou le bonheur de la douceur qui vient du Sud, merci pour ton soutien et ta constante bonne humeur, Elmira ou le charme d'Iran, Kassem, le quatrième gras ou le sage : « Zeit samac taba m'Kassem, ma tayeb tirr. » (désolée c'est phonétique), Laéticia ou le dynamisme personnifié, Lynn ou l'autre vision du fromage, Mireille ou la définitive grâce de la « libanese corporation », Rawaa ou l'emballage du futur, Suzanna ou la Queen de la bêta - Lac, Virginie la cinquième et dernière venue de la « grasse attitude », une recrue de chic de charme et de choc, et enfin l'ensemble de « l'Africa connection » pour leur bonne humeur et leur solidarité : Lili, Carine Hilaire, Elie et Aboubakar.

Et parce qu'en dehors de la thèse il y a une vie....je tiens à remercier :

Benoît ou le gendre préféré des mères de famille, Pti' Ben le roi des crêpes des pizzas et de la verveine, Ben D et Caro ou l'autre vision de la vie, la CEE team : Katharina, Cinzia, Robert, Davidou dit le catalyseur, l'homme de toutes les situations, l'équipe d'Aria (Bertrand, Ghaz, Julie, Jordane, Eric, Nadine, Naziha, Reine et Yo) bien évidemment, ARIA c'est toujours plus fort que toi !, Fredo ou le père Noël à « clochette » venu de Bretagne, Jym dit « Bob l'amoureux » ou l'interlocuteur idéal des restos en tous genres, Toufoune, et Julia les compagnes idéales de vacances, Taffa et Didine « le roi du cocktail », « Aux jeunes de la Thésards valley » : Camille, Etienne, Flore, Romain ou le colloc idéal ! et Virginie, Madame Prod, Comment ne pas oublier Marie-Lucie ou la chaleur réconfortante de Montpellier.

Une pensée particulière pour Reinette, mon autre soeur de cœur : A ta vision de la vie, ton amour des gens et du Liban et surtout à tout ce que nous avons pu partager durant cette période charnière....Que la vie t'apporte ce qu'il y a de mieux auprès de ta famille.

Et enfin, un grand merci à mes parents, ma sœur, Mimi et Maminou et à l'ensemble de ma famille pour leur amour et leur confiance.

A Seb, pour sa présence et son amour de tous les jours.

Abréviations

Abréviations

γ_{SL} : tension interfaciale

ΔT_f : variation de température

ΔG_{ads} : différence d'énergie libre entre les états adsorbés et non adsorbés

α : degré de dissociation moyen des fonctions amines libérées

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AG : acides gras

AGS : acides gras saturés

AGMI : acides gras monoinsaturés

AGPI : acides gras polyinsaturés

DSC : analyse calorimétrique différentielle

ALA : acide α -linoléique

ANC : apports nutritionnels conseillés

AU : unité Anson : quantité d'enzyme qui sous des conditions standards produit un milliéquivalent Tyrosine par minute à partir d'hydrolysate de l'hémoglobine soluble dans l'acide trichloracétique.

CCM : chromatographie sur couche mince

CPG : chromatographie en phase gazeuse

DH (%) : degré d'hydrolyse

DHA : acide docosahexaénoïque

DIF : détection par ionisation de flamme

E : enzyme

EPA : acide eicosapentaénoïque

EDTA : acide éthylènediamine tétracétique

h_{tot} : nombre total de liaisons peptidiques du substrat (meq / g de protéines) lors du dosage du degré d'hydrolyse

HDL : lipoprotéines haute densité

% H : pourcentage d'huile

% H^{té} : pourcentage d'humidité

INCA : enquête individuelle nationale sur les consommations alimentaires

LAPU : unité leucine aminopeptidase

LA : acide linoléique

MP : masse de protéines (NT x 6,25)

MS : matière sèche

MT : million de tonnes

NB : normalité de la solution alcaline

Nt : azote total pour 100 g de graines ou d'échantillon

pHi = pi = pH isoélectrique : pH où une molécule est sous sa forme zwitterionique ou ion mixte, sa charge globale étant alors nulle

PEA : procédé d'extraction par voie aqueuse

PL : phospholipides

S : substrat

SU.VI.MAX : étude de supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants

TRANSFAIR : étude permettant le suivi de l'apport en acides gras et notamment en acides gras trans de la population ouest européenne.

TCA : acide trichloracétique

TG : triacylglycérol

Sommaire

A INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	8
B ETAT DE L'ART	11
1. LA GRAINE DE COLZA	11
1.1. Généralités sur la graine de colza	11
1.2. Structure de la graine	12
1.3. Composition de la graine	14
1.4. Généralités sur l'huile de colza : applications, composition et propriétés physiques	14
1.4.1. Composition de l'huile en acides gras saturés (AGS)	16
1.4.2. Composition de l'huile en acides gras monoinsaturés (AGMI)	16
1.4.3. Composition de l'huile en acides gras polyinsaturés (AGPI)	17
1.4.4. Lipides polaires	21
1.4.5. Composants liposolubles minoritaires : les tocophérols	22
1.4.6. Propriétés physiques	25
1.4.7. Conclusions	25
1.5. Les constituants protéiques de la graine	25
1.6. Les sucres et fibres de la graine	28
2. EXTRACTION DE L'HUILE DE COLZA	30
2.1. Extraction conventionnelle de l'huile de colza	30
2.1.1. Obtention de l'huile brute	30
2.1.2. Le raffinage de l'huile	33
2.2. Méthodes alternatives de production de l'huile de colza	40
2.2.1. Recherche de solvants et de procédés d'extraction « alternatifs »	40
2.2.2. Le procédé d'extraction par voie aqueuse	41
2.2.3. Extraction aqueuse assistée par des enzymes	42
3. LES EMULSIONS D'HUILE DANS L'EAU (H/E)	45
3.1. Définition	45
3.2. Aspects énergétiques et ordres de grandeur : Non miscibilité et énergie interfaciale - Pression de Laplace	46
3.3. Emulsifiants : nature et rôle	47
3.3.1. Protéines et peptides	48
3.3.2. Polysaccharides	50
3.3.3. Lipides : les phospholipides	51
3.3.4. Stabilisants à des interfaces liquides	52
3.4. Mécanismes physiques de déstabilisation des émulsions	52
3.4.1. Crémage et sédimentation	54
3.4.2. Flocculation	54
3.4.3. Coalescence	55
3.4.4. Maturation d'Oswald	55
3.4.5. Inversion de phase	55
3.5. Paramètres physiques intervenant dans la stabilité des émulsions : facteurs de contrôle	56
3.5.1. Fraction volumique de la phase dispersée	56
3.5.2. Rhéologie des constituants de chaque phase	56
3.5.3. Taille de la goutte	57
3.6. Techniques employées pour étudier la stabilité des émulsions	58
3.7. Méthodes de déstabilisation avérées	61
3.7.1. Déstabilisation par modification du pH et de la force ionique	61
3.7.2. Déstabilisation par application d'un stress mécanique	62
3.7.2.1. Déstabilisation par homogénéisation	62
3.7.2.2. Déstabilisation par barattage	62
3.7.2.3. Déstabilisation par (ultra)centrifugation	62
3.7.3. Déstabilisation par procédés membranaires	63
3.7.4. Déstabilisation par flottation	63
3.7.5. Déstabilisation par les ultrasons	63
3.7.6. Déstabilisation par traitement thermique	64
3.7.7. Déstabilisation par application d'un faible champ électrique externe	68
3.7.8. Déstabilisation par modification des polyélectrolytes (biopolymères) du milieu	69
3.7.9. Déstabilisation par application de hautes pression	69
3.7.10. Autres méthodes	69
C MATERIELS ET METHODES	71
1. METHODE DE CONSERVATION ET ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES DE LA GRAINE	71
1.1. Méthode de conservation	71
1.2. Analyses physico-chimiques de la graine	71
1.2.1. Détermination du pourcentage d'humidité de la graine	71

1.2.1.1. Détermination du pourcentage d'humidité de la graine par la méthode physique ou méthode par étuvage.....	71
1.2.1.2. Détermination du pourcentage d'humidité de la graine par la méthode chimique ou méthode de Karl-Fischer.....	71
1.2.2. Estimation du taux de cendres.....	72
1.2.3. Détermination de la teneur en minéraux de la graine : spectroscopie atomique par ionisation de flamme.....	72
1.2.4. Evaluation de la teneur en phosphore (P) de la graine.....	72
1.2.5. Evaluation de la teneur en protéines de la graine : méthode de Kjeldahl.....	73
1.2.6. Détermination de la teneur en lipides totaux.....	74
1.2.6.1. Extraction des lipides totaux par la méthode de Bligh & Dyer (1959).....	74
1.2.6.2. Extraction de l'huile par la méthode de Soxhlet.....	75
1.2.6.3. Extraction des lipides totaux au Butanol.....	75
1.2.6.4. Extraction des lipides totaux par la méthode éthéro-ammoniacale.....	75
2. ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES DE L'HUILE ET DES LIPIDES TOTAUX.....	76
2.1. Indice d'iode.....	76
2.2. Indice de saponification.....	76
2.3. Indice d'acide (altération de la qualité de l'huile).....	77
2.4. Indice de peroxyde (altération de la qualité de l'huile).....	77
2.5. Analyse des lipides totaux par calorimétrie différentielle à balayage.....	78
2.6. Détermination de la teneur en corps gras solides par Résonance magnétique nucléaire RMN.....	79
2.7. Observation macroscopique des lipides totaux : mesure de couleur.....	80
2.8. Détermination des différentes classes de lipides par Iatroscan®.....	81
2.9. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse.....	85
2.10. Détermination spécifique des composés polaires et apolaires des lipides totaux : chromatographie sur couche mince couplée à la chromatographie en phase gazeuse.....	86
3. HYDROLYSE AQUEUSE ET ENZYMATIQUE DE LA GRAINE DE COLZA EN VUE DE L'EXTRACTION DE L'HUILE.....	87
3.1. Présentation des enzymes testées.....	87
3.1.1. Les enzymes protéolytiques.....	87
3.1.2. Enzymes de dégradation de la paroi cellulaire.....	89
3.1.3. Inactivation des enzymes.....	91
3.1.4. Cinétique de la protéolyse.....	91
3.2. Protocole des extractions aqueuses assistées par les enzymes.....	92
3.2.1. L'hydrolyse des graines.....	92
3.2.2. Centrifugation et répartition des fractions.....	93
3.2.3. Protocole expérimental.....	94
3.3. Suivi des réactions enzymatiques.....	95
3.3.1. Détermination du degré d'hydrolyse pour le suivi des protéolyses.....	95
3.3.2. Réalisation d'un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.....	96
3.3.3. Suivi de l'activité polysaccharide hydrolase (dégradation des parois cellulaires).....	96
3.3.3.1. Suivi de la dégradation des parois cellulaires par osmolarité.....	96
3.3.3.2. Mesure de la teneur en azote de l'hydrolysat.....	97
3.3.4. Observations microscopiques des particules résiduelles de l'émulsion.....	97
3.3.4.1. Observation par microscopie photonique.....	97
3.3.4.2. Observation par microscopie électronique à transmission.....	97
3.4. Réactions d'hydrolyses testées.....	98
3.5. Analyse des fractions après centrifugation.....	99
3.5.1. Détermination de la teneur en lipides totaux et en azote.....	99
3.5.2. Analyses physicochimiques des lipides totaux.....	99
3.6. Caractérisation de l'émulsion.....	100
3.6.1. Microscopie photonique.....	100
3.6.2. Diffusion statique de la lumière : mesure de la taille des particules de l'émulsion.....	100
3.6.3. Viscosité de l'émulsion.....	101
3.6.4. Conductivité de l'émulsion.....	102
4. ESSAIS DE DESTABILISATION DE L'EMULSION.....	103
4.1. Destabilisation physicochimique.....	103
4.1.1. Destabilisation par addition d'alcool.....	103
4.1.2. Destabilisation par addition de sel (NaCl).....	103
4.1.3. Destabilisation par addition d'acide phosphorique.....	103
4.1.4. Destabilisation par addition d'acide citrique.....	103
4.1.5. Destabilisation par lavage de l'émulsion.....	103
4.1.6. Destabilisation par ajout de talcs.....	103
4.2. Destabilisation thermomécanique.....	104
4.2.1. Destabilisation par dégazage.....	104
4.2.2. Destabilisation par filtration sur membrane.....	104
4.2.3. Destabilisation par congélation/décongélation.....	105
4.2.4. Destabilisation par inversion de phase.....	106
4.2.5. Destabilisation par traitement ultrasons.....	107

5. PLAN D'EXPERIENCES.....	108
5.1. Généralités.....	108
5.2. Paramétrage et définition du domaine expérimental : Choix des variables.....	108
5.3. Réponses expérimentales.....	110
5.4. Optimisation du procédé d'extraction de l'huile.....	110
D RESULTATS ET DISCUSSION	112
1. CHAPITRE I : CONSERVATION ET CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DE LA GRAINE, QUALITE DE L'HUILE.....	112
1.1. Conservation de la graine.....	112
1.2. Détermination du pourcentage d'humidité de la graine.....	112
1.3. Evaluation de la teneur en lipides totaux de la graine.....	113
1.4. Evaluation de la teneur en protéines de la graine.....	114
1.5. Evaluation de la teneur en cendres de la graine.....	115
1.6. Evaluation de la teneur en minéraux de la graine.....	115
1.7. Evaluation de la teneur en Phosphore de la graine.....	115
1.8. Conclusions.....	116
1.9. Détermination des indices de qualité des lipides et de leur composition en acides gras.....	116
1.9.1. Propriétés des lipides extraits et indices d'altération.....	117
1.9.2. Détermination des composants polaires et apolaires des lipides par Iatrosan®.....	119
1.9.3. Détermination de la composition en acides gras des lipides par chromatographie en phase gazeuse.....	121
1.9.4. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM).....	123
1.9.5. Analyse des lipides par chromatographie en phase gazeuse après chromatographie sur couche mince.....	124
1.10. Conclusions.....	126
2. CHAPITRE 2 : DESTRUCTURATION ENZYMATIQUE DU TISSU VEGETAL.....	127
2.1. Contexte actuel et choix des enzymes.....	127
2.1.1. Le choix des protéases.....	128
2.1.2. Le choix des polysaccharides hydrolases.....	129
2.2. Suivi des hydrolyses enzymatiques/.....	133
2.2.1. Suivi de la protéolyse.....	133
2.2.1.1. Suivi de la protéolyse par le degré d'hydrolyse.....	133
2.2.1.2. Suivi de la protéolyse par l'évolution de la taille des protéines dans la phase hydrolysats.....	135
2.2.2. Suivi des polysaccharides hydrolases.....	136
2.2.3. Suivi des différentes réactions par le pourcentage de matière grasse des différentes fractions.....	139
2.2.3.1. Détermination des paramètres d'hydrolyse et de centrifugation.....	139
2.2.3.2. Suivi de l'action des enzymes par le rendement en lipides des fractions.....	141
2.2.4. Analyse de la structure de la graine après le traitement enzymatique.....	145
2.3. Conclusions.....	145
2.4. Perspectives.....	146
3. CHAPITRE III : ETUDES DES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DE L'EMULSION.....	147
3.1. Etude rhéologique : Mesure de la viscosité de l'émulsion.....	147
3.2. Etude granulométrique : analyse de l'émulsion par diffusion statique de la lumière.....	149
3.3. Etude microscopique : Observation de l'émulsion par microscopie électronique.....	150
3.1. Etude de l'émulsion par conductimétrie.....	151
3.2. Suivi du pH de l'émulsion lors de sa conservation.....	151
4. CHAPITRE IV : ESSAIS DE DESTABILISATION DE L'EMULSION.....	153
4.1. Déstabilisation physicochimique.....	153
4.1.1. Déstabilisation par addition d'éthanol.....	153
4.1.2. Déstabilisation par addition de sel (NaCl).....	153
4.1.3. Déstabilisation par addition d'acides.....	155
4.1.3.1. Déstabilisation par addition d'acide phosphorique.....	155
4.1.3.2. Déstabilisation par addition d'acide citrique.....	156
4.1.4. Déstabilisation par lavage de l'émulsion.....	157
4.1.5. Déstabilisation par ajout de talcs.....	158
4.2. Déstabilisation thermomécanique.....	159
4.2.1. Déstabilisation par dégazage.....	159
4.2.2. Déstabilisation par filtration sur membrane.....	160
4.2.3. Déstabilisation par congélation/décongélation.....	162
4.3. Déstabilisation par inversion de phase.....	164
4.4. Déstabilisation par traitement aux ultrasons.....	167
5. OPTIMISATION DE LA DESTABILISATION DE L'EMULSION PAR CONGELATION : UTILISATION D'UN PLAN D'EXPERIENCES.....	170
5.1. Choix de la méthodologie de recherche expérimentale.....	170
5.2. Choix des variables.....	170
5.3. Définition du domaine expérimental.....	170

5.4. Analyse des résultats.....	174
5.4.1. Courbes isoréponses du pourcentage de lipides dans le culot.....	175
5.4.2. Courbes isoréponses du pourcentage d'huile libre.....	177
5.4.3. Courbes isoréponses du pourcentage de lipides dans l'émulsion.....	179
E CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	183
F REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	188

LISTE DES FIGURES

Figure B-1 : Microphotographie d'une section de graine de Brassica rapa mature d'1mm d'épaisseur.	13
Figure B-2 : Image obtenue au microscope électronique à transmission d'une graine intacte de Brassica napus (13% d'humidité).....	13
Figure B-3 : Image obtenue en microscopie électronique à transmission montrant l'ultrastructure d'un cotylédon de graine de Brassica rapa mature (x 3700).....	13
Figure B-4 : Métabolisme des acides gras. Conversion des acides linoléique et linoléique en AGPI longue chaîne d'après le rapport AFSSA, 2003 : acides gras et cancer.	19
Figure B-5 : Modèle de corps lipidique.	27
Figure B-6 : Structure générale des glucosinolates et produits potentiels après clivage par des myrosinases....	28
Figure B-7 : Schéma de l'extraction conventionnelle de l'huile de colza à l'aide de solvants organiques.....	32
Figure B-8 : Schéma de l'extraction par voie enzymatique : paramètres à ajuster.....	44
Figure B-9 : Représentation schématique de la localisation des phases dans une émulsion.....	46
Figure B-10 : Représentation schématique de la surface engendrée lors des procédés de production d'émulsion ou de fractionnement d'après Tadros, 1989.	46
Figure B-11 : Schéma des mécanismes physiques majeurs intervenant dans la déstabilisation des émulsions: crémage, sédimentation, floculation, coalescence, inversion de phase et maturation d'Oswald.	53
Figure B-12 : Influence du traitement thermique, de la concentration en sel et de l'ordre d'addition du sel sur le diamètre moyen d'une émulsion	66
Figure C-1 : Schéma du dispositif permettant les mesures DSC	79
Figure C-2 : Schéma représentatif de l'espace chromatique CIE L*a*b*.....	80
Figure C-3 : Schéma représentatif du principe de fonctionnement du Iatroscan®	81
Figure C-4 : Comparaison des chromatogrammes après brûlage complet ou partiel des chromatopores®	82
Figure C-5 : Représentation schématique des chromatogrammes obtenus lors de la séparation de lipides polaires.....	83
Figure C-6 : Photographies du matériel utilisé lors de l'emploi du Iatroscan®.	84
Figure C-7 : Photographie du réacteur permettant l'hydrolyse du milieu.	93
Figure C-8 : Montage utilisé lors du suivi du degré d'hydrolyse.	93
Figure C-9 : Schéma représentatif du fractionnement du milieu réactionnel après centrifugation	93
Figure C-10 : Schéma du protocole expérimental complet conduisant au fractionnement du milieu.	94
Figure C-11 : Photographie du module de filtration à quatre compartiments	105
Figure D-1 : Photographie représentant la phase de décantation lors de la méthode de Bligh & Dyer.....	118
Figure D-2 : Profil DSC des lipides totaux de la graine de colza obtenus par la méthode de Bligh & Dyer... ..	119
Figure D-3 : Chromatogramme des lipides totaux obtenus par la méthode de Bligh & Dyer.....	120
Figure D-4 : Chromatogramme des lipides totaux obtenus par la méthode de Bligh & Dyer.....	121
Figure D-5 : Représentation schématique des bandes obtenues après une chromatographie sur couche mince de silice des lipides totaux de colza obtenus par la méthode de Bligh & Dyer (1959).	123
Figure D-6 : Microstructure des cellules de la graine de colza broyée avant hydrolyse enzymatique par microscopie électronique à transmission.	127
Figure D-7 : Dégradation enzymatique des parois cellulaires de soja, d'après Toyama, 1969.....	130
Figure D-8 : Suivi du degré d'hydrolyse de différentes enzymes en fonction du temps pour des conditions optimums de rendement en lipides dans les deux fractions supérieures en fonction de l'enzyme.	134
Figure D-9 : Gel SDS-PAGE des protéines de la phase hydrolysate avec ou sans hydrolyse de la graine.	136
Figure D-10 : Evolution du point de congélation	137
Figure D-11 : Représentation de l'évolution de la teneur en azote dans la phase hydrolysate lors de l'action des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire.	138
Figure D-12 : Teneur en lipides des différentes fractions après un traitement à l'Alcalase® pour différents pH de centrifugations.	140
Figure D-13 A et B : Microstructure des cellules de la graine de colza après traitement enzymatique	145
Figure D-14 : Evolution de la viscosité en fonction du milieu à 25°C.	147
Figure D-15 : Représentation de la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement pour une émulsion obtenue après traitement à l'Alcalase®	148
Figure D-16 : Représentation logarithmique de la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement pour une émulsion obtenue après traitement enzymatique.....	149
Figure D-17 : Distribution semi-logarithmique de la taille des particules dans l'émulsion après hydrolyse enzymatique par diffusion statique de la lumière	149
Figure D-18 : Photographie obtenue par microscopie photonique de l'émulsion après traitement enzymatique	150
Figure D-19 : Suivi de la conductivité de l'émulsion obtenue après traitement enzymatique	151
Figure D-20 : Suivi du pH de l'émulsion obtenue après traitement enzymatique.	152

<i>Figure D-21 : Photographie de l'émulsion obtenue après traitement enzymatique.</i>	154
<i>Figure D-22 : Photographie de l'émulsion obtenue après traitement enzymatique après addition d'acide phosphorique.</i>	156
<i>Figure D-23 : Photographie de l'émulsion obtenue après traitement enzymatique après addition d'acide citrique.</i>	156
<i>Figure D-24 : Photographie de l'étape de lavage A et de la surface de l'émulsion A' obtenue après traitement enzymatique.</i>	157
<i>Figure D-25 : Photographie de l'étape de dégazage employée lors du fractionnement du milieu.</i>	159
<i>Figure D-26 : Photographie de l'étape de filtration réalisée sur l'émulsion après traitement enzymatique A) module de filtration, A') Filtrat aqueux.</i>	161
<i>Figure D-27 : montage "tête-bèche" de 2 valves hydrophile / hydrophobe sur la base de l'analogie avec le transistor.</i>	162
<i>Figure D-28 : Photographie permettant de visualiser le résultat d'une filtration d'émulsion d'huile de maïs dans l'eau stabilisée avec du SDS.</i>	162
<i>Figure D-29 : Photographie présentant le résultat de l'inversion de phase A) après traitement thermique puis centrifugation A').</i>	165
<i>Figure D-30 : Optimisation du rendement en lipides du culot en utilisant le plan d'expériences.</i>	176
<i>Figure D-31 : Optimisation du rendement en huile libre en utilisant le plan d'expériences.</i>	178
<i>Figure D-32 : Optimisation du rendement en lipides de l'émulsion en utilisant le plan d'expériences.</i>	179
<i>Figure D-33 : Chemins optimaux A et A' : rendement en lipides du culot ; B et B' : rendement en huile libre ; C et C' : rendement en lipides de l'émulsion.</i>	181

LISTE DES TABLEAUX

Tableau B-1 : Composition globale de la graine de colza	14
Tableau B-2 : Composition en phospholipides et en acides gras de lécithines brutes déshuilées	22
Tableau B-3 : Bilan comparatif de la composition en familles d'acides gras et tocophérols des principales huiles végétales.....	23
Tableau B-4 : Comparaison des acides gras majeurs de quelques huiles végétales (p/p %).	24
Tableau B-5 : Caractéristiques physiques de l'huile de colza à faible teneur en acide érucique.....	25
Tableau B-6 : Composition en saccharides de la graine de colza décortiquée	29
Tableau B-7 : Composition des pellicules de colza d'après Bell 1984.....	29
Tableau B-8 : Comparaison des étapes des deux principaux procédés de raffinage des huiles végétales (raffinages physiques et chimiques)	36
Tableau B-9 : Les différents procédés de dégommeage préalables au raffinage physique des huiles végétales ..	38
Tableau B-10 : Bilan des extractions enzymatiques sur les graines de colza.	43
Tableau B-11 : Techniques utilisées pour la caractérisation d'une émulsion	59
Tableau C-1: Présentation des standards utilisés lors de l'étude des classes lipidiques par Iatroscan®.	84
Tableau C-2 : Caractéristiques des enzymes utilisées.	90
Tableau C-3 : propriétés spécifiques et composition des talcs utilisés.	104
Tableau C-4 : Récapitulatif des différents traitements utilisés lors des expériences de congélation.....	106
Tableau C-5 : Domaine expérimental et niveau des facteurs retenus pour l'optimisation du procédé d'extraction de l'huile de colza.....	109
Tableau C-6 : Récapitulatif des essais réalisés lors du plan d'expériences.	109
Tableau D-1 : Teneur en eau de la graine expérimentale par les méthodes de Karl-Fischer et par étuvage.....	112
Tableau D-2 : Tableau récapitulatif de la composition physicochimique de la graine de colza utilisée, en comparaison avec les données bibliographiques.	116
Tableau D-3 : Caractéristiques chimiques de l'huile obtenue après la méthode de Bligh & Dyer.	117
Tableau D-4 : Comparaison du profil en acides gras (% aire) obtenu par CPG de lipides de colza extraits par différentes méthodes et des résultats issus de la littérature.	122
Tableau D-5 : Tableau représentatif de la composition en acides gras (% aire) des différentes classes de lipides obtenue par chromatographie sur couche mince des lipides extraits par la méthode de Bligh & Dyer (1959) et celle de Lepage et Roy (1986).	124
Tableau D-6 : Rendements en lipides obtenus par la méthode de Bligh & Dyer des différentes fractions après réactions enzymatique(s).....	142
Tableau D-7 : tableau récapitulatif des rendements obtenus lors de l'addition de NaCl à hauteur de 3% sur l'émulsion obtenue après traitement enzymatique	154
Tableau D-8 : Tableau récapitulatif des rendements obtenus lors de l'addition d'acide phosphorique et d'acide citrique à hauteur de 3% sur l'émulsion obtenue après traitement enzymatique	155
Tableau D-9 : Tableau récapitulatif des rendements obtenus lors de l'addition d'eau sur une émulsion obtenue après traitement enzymatique	157
Tableau D-10 : Analyse du pourcentage de lipides dans les fractions après addition de talc à hauteur de 1, 2 et 3% sur une émulsion obtenue après traitement enzymatique.....	158
Tableau D-11 : Résultats des tests de dégazage réalisés à l'aide d'une pompe à vide sur le milieu avant centrifugation.....	160
Tableau D-12 : Résultats des tests centrifugation à 40°C.	163
Tableau D-13 : Représentation des rendements en lipides après congélation du milieu lors d'un traitement enzymatique.....	163
Tableau D-14 : Résultats des tests d'inversion de l'émulsion par ajout d'huile avant centrifugation.....	165
Tableau D-15 : résultats du traitement aux ultrasons sur la graine entière ou sur l'émulsion	167
Tableau D-16 : Domaine expérimental et niveau de distribution des variables utilisées lors de l'hydrolyse enzymatique et le traitement de congélation.	171
Tableau D-17 : Valeurs expérimentales pour les réponses (Y1, Y2, Y3) en fonction des expériences dictées par la matrice uniforme de Doehlert ayant trois variables (X1, X2, X3)	172
Tableau D-18 : régression multilinéaires sur les différentes réponses expérimentales étudiées : (Y1, Y2 et Y3). 173	173
Tableau D-19 : Analyse de variance des différentes réponses expérimentales étudiées : (Y1, Y2 et Y3)	173
Tableau D-20 : Récapitulatif des coefficients des modèles quadratiques pour les réponses les réponses : (Y1, Y2 et Y3).....	174

Introduction générale

L'huile de colza, source de lipides de consommation humaine reconnue nutritionnellement intéressante, souffrait depuis les années 1970 d'un grave déficit d'image dans l'esprit du consommateur. Elle nécessitait donc une réhabilitation afin d'en faire ce qu'elle doit être dans un environnement nutritionnel rationnel : une huile de consommation humaine de haute qualité.

L'image de cette huile a donc changé ces dernières années. A la suite d'une large campagne publicitaire et médiatique, supportée par des résultats scientifiques avérés, le consommateur sait désormais que cette huile est nutritionnellement l'une des plus intéressantes du marché, dans un autre registre que l'huile d'olive. Par ailleurs, l'huile de colza entre dans de nombreuses formulations de produits finis, générant de nouvelles gammes de produits « santé » formulés à partir de préconisations nutritionnelles.

Toutefois, compte tenu des objections d'ordre environnemental et nutritionnel, les efforts doivent se porter sur des procédés d'extraction propres, ne mettant pas en œuvre de solvants organiques comme l'hexane. De tels procédés pourraient conduire à l'obtention d'une huile à haute image de marque santé, qui pourrait trouver une place de choix à côté de l'huile d'olive, avec un accent tout particulier sur la composition en acides gras et la richesse en acide α -linoléique, précurseur de la série des acides gras à longues chaînes dits ω 3. De plus, l'accent doit être mis également sur la production d'un tourteau à meilleure valeur nutritionnelle pour l'animal : un tourteau riche en protéines à haute digestibilité, utilisable en nutrition animale sécurisée participerait à la valorisation totale de la graine de colza, dans une approche de bioraffinerie.

A l'heure actuelle, les procédés industriels utilisés pour l'extraction des huiles de graines impliquent généralement une étape faisant intervenir un solvant organique, préférentiellement l'hexane. Cette étape est précédée d'une étape de pressage. Ces procédés permettent un rendement en huile d'environ 95% et un taux de récupération du solvant voisin de 100%. Toutefois, l'utilisation de l'hexane contribue à l'émission de gaz à effet de serre ce qui est dommageable tant au niveau santé humaine qu'environnemental. En s'appuyant sur la demande d'« authenticité des produits » fortement exprimée par le consommateur, et pour répondre à des normes environnementales de plus en plus contraignantes, l'étude présente vise à étudier les voies de transformation conduisant à moins de stress mécanique et thermique de la matière première par la mise en œuvre d'un procédé conduit à basse température et sans utilisation de solvants organiques. L'huile obtenue devra être de haute qualité et les co-produits directement valorisables en nutrition animale, le procédé générant le

moins possible de déchets ultimes. A cet effet, l'extraction aqueuse a été retenue comme le fil directeur de ce travail.

Il existe un inconvénient majeur à ce type de procédé : le rendement en huile est faible comparativement à l'extraction chimique. Ceci est largement dû au mauvais rendement de l'étape de déstabilisation de l'émulsion formée lors du processus d'extraction, qui aboutit à une quantité résiduelle d'huile dans le tourteau trop importante. De plus, les effluents aqueux incluant la concentration des hydrolysats et le recyclage de l'eau doivent être traités. Toutefois, de nombreux avantages contrebalancent ces inconvénients : il s'agit d'un procédé intégré, permettant l'obtention simultanée d'une huile comestible et d'un concentrat ou isolat protéique. Les protéines obtenues sont nettement moins endommagées thermiquement que lors d'une extraction classique, mais partiellement hydrolysée, ce qui augmente leur biodisponibilité. La sûreté du procédé est améliorée par la réduction des risques d'incendie et d'explosion. Enfin, le bilan économique bénéficie de la suppression de l'étape de récupération du solvant par distillation, tant au niveau des immobilisations que de celui de la consommation d'énergie.

Il est également à noter que le rendement en huile n'est pas forcément un problème insoluble. L'utilisation d'enzymes (protéases et polysaccharides hydrolases) permet en général de rehausser ce dernier en facilitant la libération de l'huile par déstructuration du tissu végétal. Des rendements proches de 90% en huile ont ainsi été obtenus en laboratoire et pilote. Par ailleurs, des voies de valorisation de l'ensemble des fractions obtenues lors d'un tel process ont été proposées. Les protéases et les polysaccharides hydrolases permettent également une hausse de la digestibilité du tourteau par le biais de l'augmentation de la fraction assimilable liée à l'hydrolyse partielle des protéines et des fibres. De plus, l'ensemble des étapes liées à ce procédé, rend plus aisé la séparation de certaines molécules d'intérêt, notamment les phospholipides et autres composés mineurs contenus dans les diverses fractions traitées.

C'est donc plus précisément cette voie, l'extraction aqueuse assistée par des enzymes, qui fait l'objet de la présente étude.

Une revue bibliographique en trois parties précède l'ensemble des résultats obtenus. Comme il est nécessaire de mieux discerner l'ensemble des composants en présence et leur rôle dans la stabilisation de l'émulsion formée, la première partie aborde la composition physicochimique de la graine de colza. Dans une seconde partie, une présentation des différentes techniques d'extraction et de raffinage de l'huile de colza permet de faire le point sur les méthodes employées actuellement. Et enfin, la troisième partie définit les émulsions

huile dans l'eau, leur stabilité, et expose par la suite les méthodes d'études et les techniques de déstabilisation avérées.

Un bref point sur les matériels et méthodes en seconde partie permet une présentation de l'ensemble des techniques mises en oeuvre afin de mener à bien les travaux entrepris.

Le dernier chapitre reprend enfin l'essentiel des résultats obtenus : après un bilan récapitulatif de la composition de la graine (partie I), le procédé d'extraction a été optimisé, afin de minimiser la fraction d'huile contenue dans le tourteau (partie II). L'émulsion obtenue a ensuite été caractérisée (partie III). Enfin, les travaux se sont portés sur un certain nombre de méthodes pouvant conduire à la déstabilisation de l'émulsion à l'aide de processus physiques et chimiques qui sont présentés en partie IV.

L'une des techniques a fait l'objet, en dernière partie (V), d'une optimisation par un plan d'expériences la déstabilisation de l'émulsion par cycles de congélation/décongélation.

Etat de L'art

1. La graine de colza.

1.1. Généralités sur la graine de colza.

Le colza appartient à la famille des *cruciferae* : plantes à quatre pétales disposés en croix et plus particulièrement au genre *Brassicaceae*. Il est cultivé en Hollande depuis le XVII^e siècle où il est appelé « Koolzaad » qui signifie semence (zaad) de chou (kool). Ceci s'explique par le fait qu'il résulte de l'hybridation d'une variété de chou (*Brassica oleracea*) et de la navette (*Brassica campestris*). Il existe plus de trois mille espèces dont *Brassica napus* qui fait l'objet des présents travaux. Sa variété d'hiver est la plus répandue en Europe, et sa variété d'été est principalement cultivée au Canada (Mothadi-Nia *et al.*, 1986 ; Rackow, G., 2004).

La production de ces graines a connu un réel engouement agronomique depuis les années soixante en qualité d'oléagineux métropolitain, en substitution de l'arachide jusqu'alors majoritairement utilisée en alimentation. Cet intérêt agronomique a conduit à l'amélioration des rendements et des propriétés de la graine par le biais de la sélection des lignées cultivées ainsi que par la diversification de ses débouchés. Actuellement, la graine de colza et ses dérivés sont utilisés intégralement et les produits issus sont présents sous différentes formes (tourteaux, huile, esters méthyliques) dans de multiples secteurs industriels qui vont de l'alimentation humaine (huile), animale (tourteaux) jusqu'aux domaines non alimentaires (énergie, lubrifiants, tensioactifs) (Gunstone, 2001).

Introduite au Canada en 1936, la graine comportait alors une forte teneur en acide érucique (C22:1n-9) supposé être impliqué dans l'accumulation de lipides au niveau du cœur entraînant à terme l'apparition de lésions cardiaques chez le rat (Kramer *et al.*, 1977). Les seconds facteurs antinutritionnels présents étaient les glucosinolates (composés soufrés présents dans les tourteaux) reconnus pour leurs effets goitrigènes chez les monogastriques (Fenwick *et al.*, 1983). Les efforts se sont dès lors portés sur la sélection de variétés pauvres en ces deux éléments antinutritionnels. Ceci a conduit à l'apparition en 1968 en Italie d'une variété dite « 0 » pauvre en acide érucique et en 1974 au Canada à une variété dite double zéro « 00 » rebaptisée *canola* (CANadian cOlza Low Acid), pauvre en acide érucique et en glucosinolates (Bell, 1984). A l'heure actuelle la production mondiale de colza dépasse les 48 millions de tonnes par an (Fédiol, données 2005) avec des prévisions de production à la hausse en raison des nombreux débouchés en cours de développement, et tout particulièrement ces derniers mois avec le fort développement des filières énergétiques *biodiesel*.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

Aujourd'hui, en marge des études destinées à augmenter le rendement des graines et la teneur en huile, les sélectionneurs travaillent sur l'augmentation des performances technico-économiques et l'accroissement des débouchés de la graine. Parmi les nouvelles voies envisagées, l'utilisation du génie génétique semble des plus prometteuses du point de vue strictement scientifique. Les programmes de recherche sur le colza génétiquement modifié portent sur de larges domaines aussi bien sur la résistance aux herbicides ou aux insectes que sur la composition lipidique ou protéique de la graine (Champolivier, 2002). Cependant, la biologie particulière du colza augmente les risques de dispersion interspécifique de gènes et donc les risques liés à l'introduction de nouveaux gènes par génie génétique. La commercialisation et la culture du colza génétiquement modifié restent jusqu'à présent sujettes à controverse en France et en Europe même si les progrès de la génétique ont permis l'obtention de lignées mâles stériles ayant un risque de dissémination limité (Lu *et al.*, 2004).

C'est la composition de la graine de colza "00" qui sera décrite dans le travail qui suit sachant qu'il s'agit de la variété actuellement cultivée en Europe à des fins alimentaires. Toutefois, au cours de cette étude, on emploiera le nom de colza au sens générique du terme.

1.2. Structure de la graine

Le colza est une plante dicotylédone. Les cellules présentent une double paroi cellulaire constituée de cellulose, d'hémicellulose, de lignine et de pectine. A l'intérieur des cellules de la graine se trouvent deux types d'organelles qui contiennent l'essentiel des réserves en huile et protéines de la graine.

Par microscopie électronique, on peut distinguer les corps protéiques ou grains d'aleurone (taille moyenne : 8-10 μ m, 60 à 70% des protéines totales de la graine) et les corps lipidiques, ou sphérosomes, encore appelés oléosomes (1-2 μ m), qui contiennent la majeure partie de l'huile. Les analyses microscopiques montrent aussi que dans ces cellules, les sphérosomes et les grains d'aleurone sont enchevêtrés dans une sorte de réseau qui constitue l'endosperme. De plus, la présence de protéines nommées oléosines a été mise en évidence. Ces protéines de faible poids moléculaire (15 000 à 26 000 D) ont une structure qui leur permet de jouer un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du corps lipidique en interagissant avec eux (Tzen et Huang, 1992 ; Rosenthal *et al.*, 1996 ; Leprince *et al.*, 1998). L'illustration qui suit représente la structure de graines de *Brassicacae* et permet de bien saisir toute la complexité de la compartimentation et la difficulté qui en découle à employer des procédés non drastiques censés libérer l'huile incluse (Figure B 1, Figure B 2, Figure B 3).

Caractérisation des constituants de la graine de colza

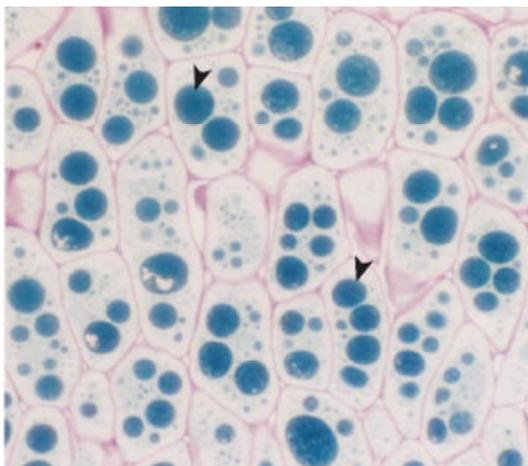


Figure B-1 : Microphotographie d'une section de graine de *Brassica rapa* mature d'1mm d'épaisseur. Le bleu d'aniline colore les protéines en bleu et le réactif de Schiff donne aux polysaccharides une coloration magenta. De larges corps lipidiques sont présents dans les cellules et on note l'absence d'amidon, les flèches indiquent la localisation des corps protéiques d'après Kuang *et al.*, 2000.

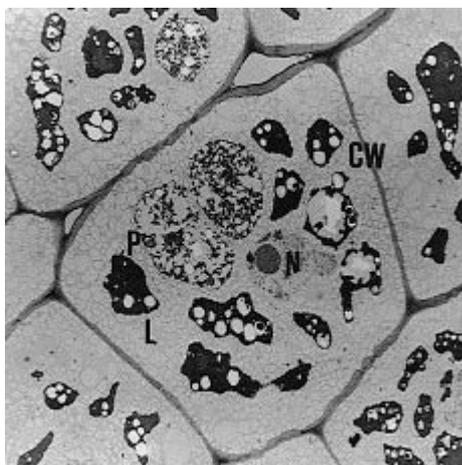


Figure B-2 : Image obtenue au microscope électronique à transmission d'une graine intacte de *Brassica napus* (13% d'humidité). paroi cellulaire (CW), corps protéiques (P), noyau de la cellule (N) et corps lipidiques (L) grossissement x 2600, reproduction à 75% de l'originale d'après Ponne *et al.*, 1996.

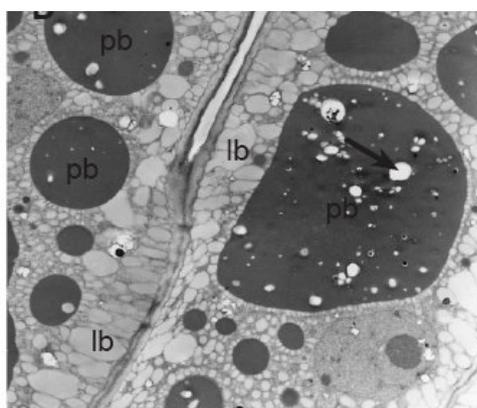


Figure B-3 : Image obtenue en microscopie électronique à transmission montrant l'ultrastructure d'un cotylédon de graine de *Brassica rapa* mature (x 3700). corps lipidiques (lb) et corps protéiques (pb), la flèche noire indique la localisation d'une mitochondrie d'après Kuang *et al.*, 2000.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

1.3. Composition de la graine.

L'étude de la composition globale de la graine va permettre une approche intégrant l'ensemble des ressources disponibles et potentielles. Il faut pourtant noter que les valeurs ne reflètent que des valeurs moyennes, étant donné que chaque variété de colza cultivée a une composition propre et que la composition de la graine varie en fonction de son degré de maturation, de son patrimoine génétique et des conditions agro-environnementales. Ces données ne peuvent donc être exploitées qu'à titre indicatif et il est nécessaire de faire l'analyse de chaque variété cultivée afin d'en connaître la composition exacte.

Toutefois des caractéristiques communes se dégagent. La graine de colza est dite « oléagineuse ». Elle est caractérisée par une forte proportion d'huile (35 à 42% de la masse de la graine entière). La fraction protéique pour une graine entière non dépelliculée correspond, d'après la littérature, à environ 30 % de sa masse totale. Quant à la pellicule entourant cette graine, elle équivaut à 16,0 à 18,6% de sa masse selon Bell (1984). Les polysaccharides et fibres sont eux aussi des composants majeurs de cette dernière. Principalement présents dans la coque et dans les parois des cellules de l'endosperme, leur teneur équivaut à 20-28 % de la masse totale de la graine (Tableau B 1).

Tableau B-1 : Composition globale de la graine de colza d'après Bell, 1984 et 2001 ; Prakash et Rao, 1986.

	<i>humidité (%)</i>	<i>huile (%)</i>	<i>protéines (%)</i>	<i>polysaccharides et fibres (%)</i>	<i>cendres (%)</i>
<i>composition de la graine</i>	6-7	38-42	25-30	20-28	3-4

1.4. Généralités sur l'huile de colza : applications, composition et propriétés physiques.

L'industrie alimentaire est l'un des principaux débouchés de l'huile de colza (2,6 millions de tonnes (MT) par an dans l'union européenne en 2005) où elle est utilisée dans des secteurs variés tels que la production d'huile pour vinaigrette, de mayonnaises ou d'autres produits émulsionnés, la biscuiterie et la conserverie (Proléa Amsol, juillet 2001 ; Conseil de direction du 16/11/2005 Oniol). Longtemps interdite en raison de son fort taux d'insaturation et donc d'une instabilité à la chaleur, l'huile de colza vient d'être autorisée en friture, et son utilisation tend à s'y généraliser compte tenu de ses propriétés nutritionnelles (exemple : huile 100% colza Lesieur avec la mention : huile végétale pour friture et assaisonnement, ressource internet : http://www.lesieur.com/lesieur_com/fr/produit/c_canola.html). Quatrième huile de

Caractérisation des constituants de la graine de colza

consommation dans l'union européenne (U.E.) derrière les huiles de soja, de tournesol et d'olive, sa consommation augmente de façon régulière et significative depuis 1995.

Une autre voie d'utilisation existe cependant dans le domaine non-alimentaire. L'huile de colza, après transformation, connaît de nouveaux débouchés dans la production de biocarburants plus connus sous le nom de Diester (contraction de diesel et d'ester, rapport Proléa et Amsol, 2001 ; Dewulf *et al.*, 2005), débouchés qui pourraient devenir majoritaires compte tenu des programmes récents de développement des bio-carburants. Cette huile peut aussi servir de source d'acide gras spécifiques notamment pour la production de lignées enrichies en un composé particulier, par exemple l'acide érucique, utilisé dans divers secteurs industriels tel que l'industrie des détergents et des lubrifiants (Champolivier, 2002). La production d'huile de colza, dopée par les besoins en biocarburants, a augmenté de 30% en trois ans dans l'U.E.. Ainsi, la consommation européenne d'huile de colza à des fins non alimentaires a doublé depuis 2003 pour atteindre plus de 3 millions de tonnes (MT). Les plus gros consommateurs d'huile de colza pour la production de biodiesel étant l'Allemagne (2 MT en 2005) et la France (environ 0,6 MT). Ces débouchés énergétiques des oléagineux font aujourd'hui l'objet d'une attention toute particulière compte tenu des tensions sur les marchés pétroliers et de la prise de conscience des milieux scientifiques et politiques de la nécessité de modifier le ratio carbone renouvelable / carbone fossile dans notre consommation industrielle et ménagère. On peut enfin noter que les co-produits issus de la graine (majoritairement les protéines) trouvent une bonne valorisation dans le domaine de la nutrition animale sous forme de tourteaux, avec une teneur en huile résiduelle de 1 à 6 % en fonction des méthodes d'extraction mises en oeuvre (Young, 1982 ; Mc Kevith, 2005). La consommation de tourteaux de colza a fortement progressé en France l'an dernier à 1,4 MT (+40%) notamment du fait de sa disponibilité constante à longueur d'année. Le tourteau de colza représente désormais plus de 20% de la consommation de tourteaux oléagineux. Cette progression ne peut que s'accroître à moyen terme puisque la progression de la production d'huile végétale pour les biocarburants ira de pair avec un net accroissement des coproduits issus de la trituration du colza (Oniol : conseil de direction du 16/11/2005).

Le principal débouché de la graine de colza étant son huile, le paragraphe qui suit résume donc ces principales propriétés.

De façon générale, les huiles brutes sont essentiellement constituées de triacylglycérols (trois acides gras (AG) estérifiés sur une molécule de glycérol) et de fractions mineures comprenant des acides gras libres, des monoacylglycérols, des diacylglycérols, des phospholipides, des glycolipides et une fraction insaponifiable (stérols, hydrocarbures, tocophérols). Chez le

Caractérisation des constituants de la graine de colza

colza, l'ensemble de ces fractions mineures représente 2 à 3% de l'huile totale (Salunkhe *et al.*, 1992). C'est la composition d'une huile en ces différentes fractions qui lui confère un grand nombre de ses particularités physicochimiques et ses qualités nutritionnelles, ceci nécessite donc une revue détaillée.

1.4.1. Composition de l'huile en acides gras saturés (AGS)

L'huile de colza contient seulement 6 % d'AG saturés ce qui est relativement faible comparativement aux huiles végétales communément consommées (environ 11 % pour le tournesol et 15 % pour le soja). Cette particularité contribue à son intérêt nutritionnel. En effet, plusieurs facteurs de risque nutritionnels, dont le contenu en AG saturés, sont associés au développement des maladies cardio-vasculaires à coté d'autres facteurs de types comportementaux ou génétiques, comme l'hypertension artérielle, le tabagisme, la sédentarité, l'obésité, le diabète, les antécédents familiaux et les dyslipidémies (taux sanguin élevé de cholestérol total, de HDL-cholestérol (lipoprotéines haute densité) et/ou de triacylglycérols). Dans ce dernier cas, il a été montré que la quantité de graisse saturée consommée a un effet plus important sur la variation du taux de cholestérol sanguin que la simple ingestion de cholestérol par voie alimentaire. Plusieurs études ont clairement montré que les graisses saturées sont le constituant alimentaire qui influence le plus le cholestérol total et le "mauvais cholestérol" (lipoprotéines basse densité). L'AFSSA, par le biais des Apports Nutritionnels Conseillés, recommande de limiter l'ingestion d'AGS à 8% de l'apport énergétique total (ANC, Martin, 2001, Chapitre *Etat de l'art* 1.4.3), en notant toutefois que l'apport d'acide gras saturé est nécessaire et doit représenter 30% de la ration lipidique pour qu'elle soit équilibrée. L'huile de colza, par son faible contenu en AGS, contribue entre autres effets bénéfiques, à respecter cette proportion.

1.4.2. Composition de l'huile en acides gras monoinsaturés (AGMI).

Les AGMI représentent environ 61% des acides gras totaux. L'acide oléique (C18:1) est le constituant majeur de l'huile de colza (60,1%). Après l'huile d'olive, cette huile est donc une source majeure d'acide oléique, à qui l'on prête un rôle hypocholestérolémiant assez controversé. Plus récemment, un rôle dans la régulation du développement des cellules tumorales a été démontré sur des cultures *in vitro* de cellules du sein (Menendez *et al.*, 2005). Même si ces rôles bénéfiques sont plutôt discutés, aucun rôle délétère n'a été prouvé ce qui est déjà plus qu'appréciable.

*Caractérisation des constituants de la graine de colza**1.4.3. Composition de l'huile en acides gras polyinsaturés (AGPI).*

Les deux principaux AGPI de l'huile de colza sont l'acide linoléique (LA) et l'acide α -linoléique (ALA), respectivement précurseurs des familles d'AG oméga-6 et oméga-3 dont ils permettent la biosynthèse (Figure B 4). Les termes « oméga-3 et 6 » signifient que la première double liaison dans la structure carbonée de l'acide gras, en comptant à partir du groupement méthyle terminal, occupe respectivement le troisième et le sixième rang (oméga parce que l'on compte depuis la fin (oméga : dernière lettre de l'alphabet grec) et 3 parce que c'est le rang qu'occupe la double liaison).

Ces AG sont considérés comme indispensables car le métabolisme humain ne peut les synthétiser, leur apport doit donc avoir lieu par le biais de l'alimentation. On les qualifie également d'essentiels car l'organisme a besoin de ces précurseurs métaboliques.

✓ **Rôles des acides gras oméga-6 et oméga-3.**

De nombreuses études tendent à prouver que les AG oméga 3 et 6 ont des rôles bénéfiques spécifiques pour la santé. Ils interviendraient dans le maintien de l'intégrité cellulaire lors la réponse immunitaire (Kelley, 1996) et pourraient jouer un rôle lors de certaines maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde (Kremer, 2000). De plus, les oméga 3 protégeraient contre l'apparition et la progression de certains cancers, où ils auraient une fonction d'inhibiteur (Saadatian *et al.*, 1999; Bougnoux *et al.*, 2000). Dans l'huile de colza, les AGPI représentent à eux seuls environ 32% des AG totaux, soit respectivement 23 et 9% d'acides linoléique et linoléique.

Dans l'état actuel des connaissances, on sait que les acides gras oméga-3 contribuent aussi au développement du cerveau et des organes sensoriels du nourrisson, qu'ils préviennent certains aspects des maladies cardiovasculaires obstructives et qu'ils sont impliqués dans diverses maladies inflammatoires, ainsi que dans le diabète et l'ostéoporose (Bourre, 2005). Quant à la psychiatrie, elle s'est intéressée aux acides gras oméga-3 pour plusieurs raisons : d'abord, le cerveau en est particulièrement riche (notamment sous forme de phospholipides), ensuite des études expérimentales ont montré qu'une carence en oméga-3 induit des déficits comportementaux et cognitifs chez les rongeurs en termes d'apprentissage (Bourre *et al.*, 1989), de mémorisation et d'habituation (Frances *et al.*, 2000), associés à des anomalies du métabolisme de certains neuromédiateurs (Kodas *et al.*, 2002). Enfin, ces différents déficits peuvent être corrigés par une alimentation adaptée (Carrie *et al.*, 2000).

✓ Impact sur le développement du cerveau et répercussions.

Différents travaux expérimentaux ont clairement démontré un effet des acides gras oméga-3 sur la structure et le fonctionnement du cerveau. La différenciation et la fonctionnalisation de cultures cellulaires de cerveau dissocié nécessitent ainsi la présence d'acides gras oméga-3 et 6 (Bourre *et al.*, 1983). Parallèlement, une carence alimentaire en ALA altère le cours du développement cérébral, perturbe la composition et la physicochimie des membranes des neurones (comme celle des oligodendrocytes et des astrocytes), de la myéline et des terminaisons nerveuses (Bourre *et al.*, 1984). Elle s'accompagne de l'apparition de perturbations neurosensorielles et comportementales. On sait qu'il existe, pendant les périodes de gestation et d'allaitement, une relation entre la quantité d'ALA présente dans l'alimentation maternelle et l'accumulation de ces composés dans le cerveau du fœtus ou du nouveau-né, jusqu'à l'observation d'un optimum (Bourre *et al.*, 1989). En conséquence, la présence d'ALA dans les laits pour nourrissons est susceptible de conditionner l'acquisition de bonnes capacités visuelles et le développement de certaines fonctions cérébrales, notamment motrices et intellectuelles mesurées par le quotient de neuro-développement et le quotient intellectuel (Bourre *et al.*, 2003).

Caractérisation des constituants de la graine de colza

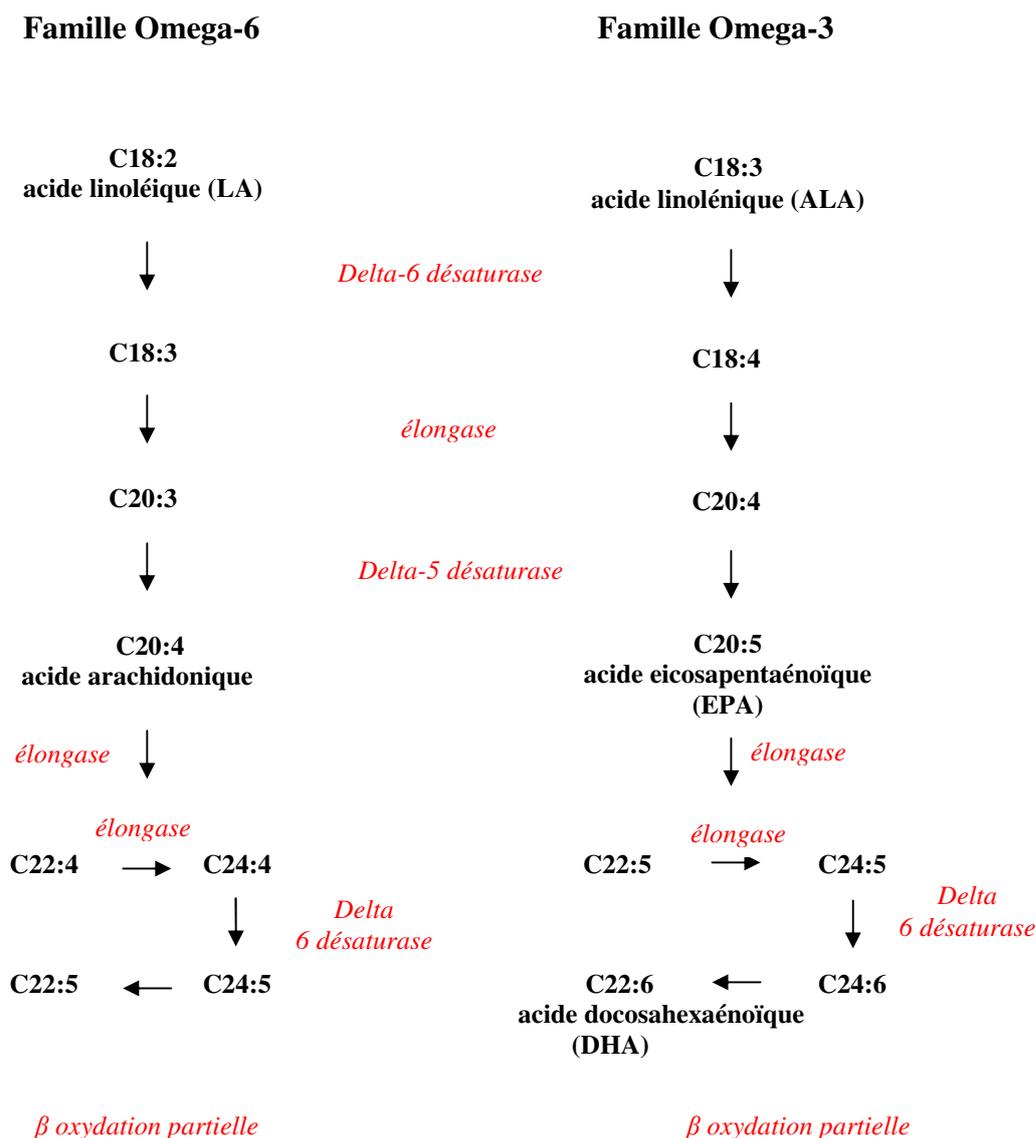


Figure B-4 : Métabolisme des acides gras. Conversion des acides linoléique et linoléique en AGPI longue chaîne d'après le rapport AFSSA, 2003 : acides gras et cancer.

✓ Consommation en oméga 3 et 6.

L'estimation du niveau de consommation des acides gras oméga-3 dans la population française constitue une donnée essentielle permettant de déterminer le bien fondé d'un enrichissement de notre alimentation en ces nutriments. L'étude INCA (enquête individuelle nationale sur les consommations alimentaires portant sur un échantillon représentatif de la population française, sujets âgés de plus de 15 ans) et l'étude SU.VI.MAX (étude de supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants, "étude nutrition prévention santé" portant sur des adultes volontaires âgés de 35 à 60 ans) ont servi d'appui à l'estimation des apports en acides gras oméga-3 dans la population française adulte. Cette estimation a souffert d'un certain nombre de limites méthodologiques :

Caractérisation des constituants de la graine de colza

- difficulté d'évaluation des apports lipidiques en raison des petites quantités soumises à de grandes variabilités intra et interindividuelles ;
- imprécisions sur les tables de composition des aliments (données de composition incomplètes) ;
- méconnaissance de l'influence des traitements technologiques et thermiques.

Toutefois, il ressort de ces travaux de recherche que l'apport moyen en acide α -linoléique est très faible alors que trois noix suffiraient pour couvrir l'apport quotidien (environ 0,1 % de l'apport énergétique total dans l'étude INCA (Volatier, 2000) et 0,4 % dans l'étude SU.VI.MAX), et que la quasi totalité des individus ont des apports ne couvrant pas l'Apport Nutritionnel Conseillé (0,8 % de l'apport énergétique total). De plus, il apparaît que cet apport est essentiellement assuré par les produits animaux ou d'huiles végétales pauvres en acide linoléique, l'huile de colza étant relativement peu consommée en France jusqu'à ces dernières années. Ceci s'explique par le fait que cette huile souffre d'un déficit d'image hérité d'un passé malencontreux, contrairement à l'huile de tournesol, portée depuis plus de 30 ans par une communication positive. Le résultat est que les apports moyens en acide linoléique sont plus de 10 fois supérieurs aux apports moyens en acide α -linoléique, ce qui atteste d'un déséquilibre d'apport entre ces deux familles d'acides gras. Cette insuffisance d'apport en ALA est confirmée par d'autres travaux, notamment l'étude TRANSFAIR (Hulshof *et al.*, 1999, étude européenne multicentrique) et l'étude AQUITAINE (Combe et Boué, 2001, femmes âgées de 18 à 50 ans).

En ce qui concerne les acides gras oméga-3 à longues chaînes (EPA et DHA), les données de composition des aliments restent trop parcellaires pour permettre une estimation fiable de leurs apports précis dans la population française, mais on sait que le déficit est important compte tenu de la faible part des poissons gras dans les habitudes alimentaires.

D'autre part, des études *in vitro* mais aussi *in vivo*, ont montré que les acides oméga-3 et 6 entrent en compétition vis-à-vis des mêmes enzymes du métabolisme des AGPI longue chaîne (Figure B 4). Un afflux de substrat oméga-6 est donc susceptible d'abaisser la biosynthèse d'EPA et de DHA à partir de leur précurseur ALA (Rapport AFSSA, 2003). Ceci peut donc avoir une répercussion sur le flux du métabolisme des AG et donc sur les processus métaboliques dans lesquels sont engagés les dérivés issus de cette voie de biosynthèse.

✓ **Le ratio oméga 6 / oméga 3**

En ce qui concerne les AGPI, outre les ANC fixés pour les acides linoléique (18:2 n-6) et alpha-linoléique (18:3 n-3), il est recommandé que le rapport oméga 6 / oméga 3 ne dépasse

Caractérisation des constituants de la graine de colza

pas 5. A l'heure actuelle, ce rapport est en moyenne égal à 11 dans les deux sexes, et supérieur à 5 pour plus de 95 % de l'échantillon étudié lors de l'étude SU.VI.MAX. Cette valeur moyenne masque des extrêmes beaucoup plus élevés pour certains groupes de populations en fonction des habitudes alimentaires. A titre indicatif, il est de l'ordre de 30 aux Etats-Unis.

Il apparaît donc qu'une politique visant à accroître le niveau des apports en acides gras oméga-3 dans la population française est souhaitable (Rapport AFSSA, 2003 sur les acides gras de la famille oméga-3 et le système cardiovasculaire). Ceci pourrait être en partie réalisé par un changement du comportement des consommateurs suite à une sensibilisation aux bénéfices de l'utilisation d'huile de colza, entre autres, dans leur ration alimentaire.

1.4.4. *Lipides polaires.*

On peut représenter une huile par sa composition en glycérides et sa fraction d'insaponifiables. Sosulski et ses collaborateurs ont étudié en 1981 la composition lipidique de variétés de colza incluant notamment une variété pauvre en acide érucique par le biais d'une extraction chloroforme/méthanol/eau. Cette variété a montré des contenus en phospholipides, glycolipides et lipides neutres qui représentaient respectivement 3,5, 0,9 % et 95,5 % des lipides totaux. On peut donc estimer que l'huile brute de colza contient une fraction importante de lipides polaires qui vont jouer un rôle stabilisateur des émulsions engendrées lors de l'extraction par voie aqueuse de l'huile. La répartition des phospholipides obtenue par Sosulski *et al.* en 1981 était la suivante : phosphatidylcholine (PC) : 48,1 %, phosphatidylinositol (PI) : 19,5 %, phosphatidyléthanolamine (PE) : 8,9 % des phospholipides totaux. Une étude plus récente dresse le bilan de la répartition de l'ensemble des composés polaires présents dans diverses huiles. Le Tableau B 2 reprend l'ensemble de ces données et permet la comparaison avec diverses classes de lipides polaires d'origine végétales ou animales. Comme on peut l'observer, la teneur en PC, PE et PI pour la graine de colza varie de façon considérable par rapport à l'étude de Sosulski et ses collaborateurs. Ceci peut être imputé soit à la méthode d'extraction utilisée, soit à la variété des graines étudiées, soit à ces deux facteurs.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

Tableau B-2 : Composition en phospholipides et en acides gras de lécithines brutes déshuilées d'après Schneider, (1997).

	lécithines d'origines végétales (%)				lécithines d'origines animales (%)		
	soja	colza	tournesol	maïs	oeufs	lait*	cerveau
<i>phospholipides</i>							
<i>PC</i>	21,9	24,6	25,4	30,4	74	27	32,4
<i>PE</i>	13,6	22,1	11	3,2	19,1	36,4	23,5
<i>PI</i>	12,0	14,7	19,4	16,3	0,4	-	4,3
<i>PS</i>	-	-	0,8	1	-	-	11
<i>PG/DPG</i>	2,3	-	1,2	1,4	0,6	-	2,1
<i>PA</i>	5,8	-	3,3	9,4	-	-	0,9
<i>NAPE</i>	2,8	-	1	2,6	-	-	-
<i>SPM</i>	-	-	-	-	2,5	29	20,4
<i>lysoPL</i>	2,9	19,4	-	5,4	2,9	-	3
<i>autres</i>	3,6	19,2	-	-	0,5	7,6	-
<i>acides gras</i>							
<i>12 :0</i>							
<i>14 :0</i>							
<i>16:0</i>	21,4	18,3	14,8	22,8	30	-	1
<i>16 :1</i>							
<i>18:0</i>	3,8	0,6	3	1,5	16	-	41
<i>18:1</i>	12,0	21,3	13,3	26,5	29	-	31
<i>18 : 2</i>	57,0	47,9	68,7	48,5	14	-	-
<i>18:3</i>	5,8	7,4	-	0,7	1	-	-
<i>20 :0</i>							
<i>20:4</i>	-	-	-	-	5	-	3
<i>22:6</i>	-	-	-	-	3	-	8
<i>autres</i>	-	-	-	-	-	2	16

PC : Phosphatidylcholine, PE : Phosphatidyléthanolamine, PI : Phosphatidylinositol, PS : Phosphatidylsérine, DPG : Diphosphatidylglycérol, NAPE : N-acylPE, SPM : Sphingomyéline, LysoPL : lysophospholipides. Les phospholipides du lait réfèrent seulement aux lipides polaires contenant du phosphore.

1.4.5. Composants liposolubles minoritaires : les tocophérols.

Les huiles végétales sont la source essentielle de tocophérols dans les régimes alimentaires. L'huile de colza constitue une ressource intéressante de tocophérols (88 mg pour 100 g d'huile) dont 26,3 mg d' α -tocophérol pour 100g d'huile comportant l'activité vitaminique E (Gunstone, 2001). La vitamine E est une vitamine liposoluble ayant pour fonction de stabiliser les membranes cellulaires. Outre cette fonction, elle joue un rôle anti-oxydant dans le plasma sanguin. Elle participe à l'élimination des radicaux libres en les neutralisant. De

Caractérisation des constituants de la graine de colza

plus, la présence abondante d' α -tocophérol, très bon antioxydant des phases grasses, contribue à la protection naturelle et à la conservation de l'huile extraite.

Les deux tableaux qui suivent (Tableau B 3 et Tableau B 4), présentent un bilan de la composition moyenne des huiles de diverses graines et permettent la comparaison des teneurs en différents AG des principales huiles végétales du marché.

Tableau B-3 : Bilan comparatif de la composition en familles d'acides gras et tocophérols des principales huiles végétales.

	AGS (% d'huile totale)	AGMI (% d'huile totale)	AGPI (% d'huile totale)	ratio n-6/n-3	tocophérols (ppm)				
					α	β	γ	δ	total
<i>canola</i> (Westar)	8	62	30	3	272**	0,1**	423*	nd**	695**
<i>soja</i>	16	24	57	7	45	12	288	109	1263
<i>tournesol</i>	13	22	66	144	611	17	15	nd	649
<i>mais</i>	15	28	57		783	159	8	nd	nd
<i>olive</i>	15	74	10	16	89%*	$\beta+\gamma=10%*$		2%*	12-190 mg/kg*

D'après Przybylski, 2001, Ackman, 1990, Eskin *et al.*, (1996)** et Firestone *et al.*, (1996).
avec AGS : Acides gras saturés ; AGMI : Acides gras monoinsaturés ; AGPI : Acides gras polyinsaturés,
nd : non déterminé.

Comme on peut l'observer sur le Tableau B 4, l'huile de colza présente le profil le plus proche de celui conseillé par l'AFSSA en comparaison des autres huiles de consommation alimentaire : un faible taux d'acides gras saturés, un fort taux de mono et polyinsaturés et surtout un ratio AG oméga-6 / oméga-3 permettant de s'approcher de celui indiqué par l'ensemble des enquêtes nutritionnelles. Il faut toutefois noter que ces observations ne tiennent pas compte de la répartition spécifique des acides gras qui joue un rôle essentiel lors de l'assimilation des lipides.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

Tableau B-4 : Comparaison des acides gras majeurs de quelques huiles végétales (p/p %).

acides gras	canola ^a	colza ^c	HEAR ^a	LL-canola ^b	colza (faible teneur en acide érucique)	Palme malaysienne ^e	soja ^a	tournesol ^f	maïs ^a	olive ^d
<i>C12:0</i>						0,2				
<i>C14:0</i>	0,1	nd	nd	0,1	nd-0,2	1,1	0,1	0,1	nd	tr
<i>C16:0</i>	3,5	4,2	4	3,9	2,5-7	44,0	10,8	6,2	11,4	12,1
<i>C17:0</i>	nd	nd	nd	nd	nd-0,3	nd	nd	nd	nd	0,1
<i>C18:0</i>	1,5	1,6	1	1,2	0,8-3	4,5	4,0	4,3	1,9	2,6
<i>C20:0</i>	0,6	0,5	1	0,6	0,2-1,2	0,4	nd	0,3	nd	0,4
<i>C22:0</i>	0,3	0,1	0,8	0,4	nd-0,6		nd	0,8	nd	0,1
<i>C24:0</i>		nd		nd	nd-0,3		nd	0,3	nd	0,1
<i>Total saturés</i>	6,0	6,4	6,9	6,2		50,2	14,9	12,0	13,3	15,4
<i>C16:1</i>	0,2	0,2	0,3	0,2	nd-0,6	0,1	0,2	0,1	0,1	0,5
<i>C17:1</i>	nd	nd	nd	nd	nd-0,3	nd	nd	nd	nd	0,2
<i>C18:1</i>	60,1	57,6	15	61,1	51-70	39,2	23,8	20,2	25,3	72,5
<i>C20:1</i>	1,4	nd	10	1,5	0,1-4,3	nd	0,2	nd	nd	10,3
<i>C22:1</i>	0,2	nd	45,1	0,1	nd-2	nd	nd	nd	nd	nd
<i>total monoinsaturés</i>	61,9	57,8	70,1	62,9		39,3	24,2	20,3	25,4	83,8
<i>C18:2n-6</i>	20,1	19,7	14,1	27,1	15-30	10,1	53,3	63,2	60,7	9,4
<i>C18:3n-3</i>	9,6	9,6	9,1	2,1	4-14	0,4	7,1	0,1	nd	0,6
<i>Total polyinsaturés</i>	29,7	29,3	23,2	29,2		10,5	60,4	63,3	60,7	10,0

^a d'après Ackman, 1990, ^b d'après Eskin *et al.*, 1996, ^c d'après le Ministère de l'Agriculture anglais, 1998, ^d d'après Mielke, world oilseed, 2001, ^e d'après Huy, 1996. Avec : HEAR : colza à haute teneur en acide érucique, LL-canola : colza à faible teneur en acide linoléique, nd : non déterminé.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

1.4.6. Propriétés physiques

Du fait de sa composition en acides gras et en éléments mineurs, chaque huile a des propriétés physiques qui lui sont spécifiques. Les propriétés de l'huile de colza sont répertoriées dans le Tableau B 5 qui suit.

Tableau B-5 : Caractéristiques physiques de l'huile de colza à faible teneur en acide érucique.

paramètres	valeurs
<i>densité (g/cm³, 20°C/H₂O 20°C)</i>	0,914-0,917*
<i>indice de réfraction (nD 40°C)</i>	1,465-1,467*
<i>viscosité (20°C, mm²/sec)</i>	78,2*
<i>point de fusion (°C)</i>	-9*
<i>chaleur spécifique (J/g à 20°C)</i>	1,910-1,916**
<i>conductivité thermique (W/m°K)</i>	0,179-0,188**

D'après * Eskin *et al.*, 1996 et ** Przybylski, 2001.

1.4.7. Conclusions.

L'huile de colza est une huile présentant un très bon profil d'acides gras du point de vue nutritionnel. Elle s'avère particulièrement saine en contribuant à l'équilibre des apports lipidiques (AG saturés/AG insaturés, AG oméga-6/AG oméga-3). De plus, la grande diversification de ses débouchés en fait une huile de fort intérêt industriel.

Dans le cadre cette étude, la présence de composants mineurs amphiphiles tels que les phospholipides, ou la nature des parois cellulaires difficilement déstructurées car peu accessibles, contribuent à la difficulté de l'extraction de cette huile par voie aqueuse sous assistance enzymatique.

1.5. Les constituants protéiques de la graine.

Pour un contenu global en protéines de 30% environ, la répartition dans la graine précisée par Niewiadomski en 1990 est la suivante : 7,6% dans la pellicule, 16,7% dans le germe et 76,3% dans les cotylédons. L'azote contenu dans les graines de colza correspond à 87% d'azote protéique et 13% d'azote peptidique et d'acides aminés libres (Niewiadomski, 1990 ; Sosulski, 1983). Les protéines majoritaires de la graine de colza sont la cruciférine (globuline 11S), la napine (albumine 2S) et les oléosines (protéines des corps lipidiques) (Mohamed Salleh *et al.*, 2002).

Caractérisation des constituants de la graine de colza

Les protéines de colza peuvent être réparties en trois grands groupes : les protéines de réserve, les protéines de structure et les protéines douées d'activités enzymatiques.

√ **Les protéines de réserve.**

Les protéines de réserve sont prépondérantes et représentées par une fraction albumine soluble dans l'eau (10-100 kDa), et par une fraction globuline (130-150 kDa) soluble en solution saline (Gill et Tung, 1978). Ces deux fractions se trouvent localisées dans la graine au niveau de corps protéiques plus connus sous le nom de grains d'aleurone. Elles représentent respectivement 40 et 28 % de l'azote total de la graine.

La fraction albumine.

Dans la graine de colza, la fraction albumine est majoritairement représentée par des protéines de type 1,7-2S et est caractérisée par une teneur élevée en acides aminés soufrés et en lysine (Guéguen et Azanza, 1985).

La principale albumine est la napine, protéine de réserve, fortement basique (point isoélectrique > 9) et de faible masse moléculaire (8-14 kDa). Elle est constituée de deux sous-unités reliées par deux ponts di-sulfure et possède une très grande résistance à la chaleur (Lemarié *et al.*, 1996).

La fraction globuline.

Les globulines sont des protéines de type 11-12S. La majeure partie des globulines du colza est constituée par les cruciférines. Ces protéines de type 12S sont des glycoprotéines contenant près de 13% de glucides (arabinose, galactose, inositol, glucosamine et mannose) (Sosulski, 1983). Les cruciférines représentent 60% des protéines de réserve de la graine de *Brassica napus* (Kohno-Murase *et al.*, 1995). Elles sont composées d'acides aminés caractéristiques des protéines de réserve, riches en acides aspartique et glutamique (et leurs amides) d'une part, et en arginine d'autre part (Guéguen et Azanza, 1985). Leur structure est de type hexamérique. Chaque sous-unité est composée de deux chaînes (une chaîne acide et une chaîne basique), reliées par des ponts di-sulfure (Lemarié *et al.*, 1996). Le point isoélectrique de cette fraction protéique est légèrement basique (7,2 ; Schwenke *et al.*, 1981) et elle présente un caractère hydrophobe marqué.

√ Les protéines de structure.

Les protéines de structure prépondérantes sont connues sous le nom d'oléosines. Leur structure particulière implique qu'elles soient intégrées au niveau de la membrane des globules lipidiques dont elles assurent le maintien en empêchant la coalescence de l'huile lors de la dessiccation de la graine (Parmenter *et al.*, 1995, Leprince *et al.*, 1998), (Figure B 5).

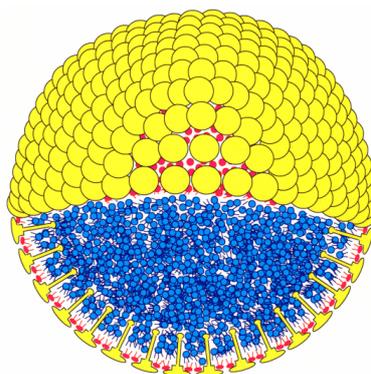


Figure B-5 : Modèle de corps lipidique.

L'huile en bleu, les phospholipides en rouge et les oléosines en jaune sont représentés de façon proportionnelle. Toutefois la taille relative du corps lipidique par rapport à la taille des molécules est diminuée de façon à révéler la structure de la surface.

(ressource internet : <http://www.cepceb.ucr.edu/members/huang.htm> et Huang, 1996)

√ Protéines douées d'activité enzymatique.

Comme toute espèce vivante la graine de colza possède un grand nombre d'enzymes. Parmi celles-ci, la myrosinase intéresse de nombreux chercheurs. En effet, son activité réduit la valeur nutritionnelle du tourteau.

Cette enzyme fait partie de la fraction albumine et est codée par une vingtaine de gènes issus de trois familles différentes MA et MB et MC (Rask *et al.*, 2000). Ces gènes permettent la synthèse d'isoenzymes dont la concentration varie en fonction du stade de développement de la graine. Ces protéines sont synthétisées à tous les stades de maturation de la graine et stockées dans des grains de myrosine situés dans des cellules spécifiques dites cellules de myrosine (2 % des cellules de la graine). Comme le soulignent Lenman et ses collaborateurs en 1993, les gènes de la myrosine sont exprimés dans des cellules particulières et leur transcription est régulée de façon spatiale et temporelle.

L'activité des myrosinases est une activité thioglucoside glucohydrolase (Figure B 6). Leurs substrats sont les glucosinolates (ou thioglucosides) qu'elles hydrolysent pour former principalement des isothiocyanates et des oxazolidine-thiones (Sosulski, 1983), responsables de dysfonctionnements physiologiques chez les animaux comme l'hypertrophie thyroïdienne.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

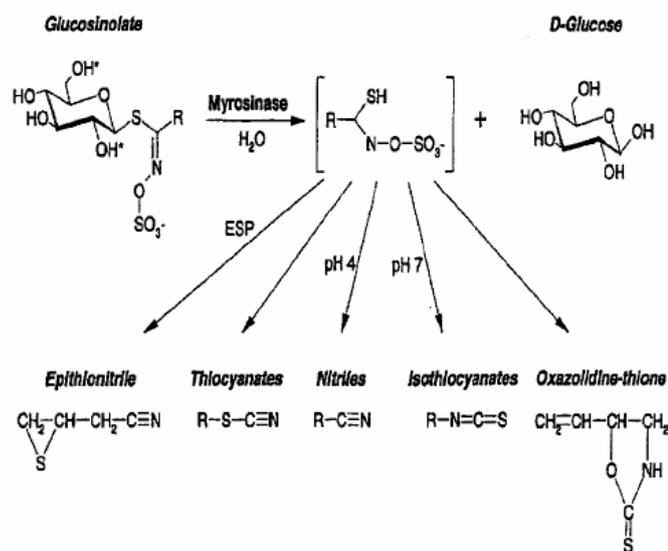


Figure B-6 : Structure générale des glucosinolates et produits potentiels après clivage par des myrosinases d'après Andréasson *et al.*, 2001.

R est la chaîne latérale de l'acide aminé. La protéine épithio-spécifique (ESP), le pH et d'autres paramètres sont les facteurs importants pour la détermination du produit formé.

A l'heure actuelle, de nombreuses études tentent de valoriser l'ensemble de la fraction azotée, co-produit de l'extraction de l'huile. Cette fraction est communément appelée « tourteau » et est principalement utilisée en nutrition animale, ou par le biais de l'isolation de peptides dotés de propriétés spécifiques (hypertensives par exemple) en industrie pharmaceutique (Al-Shamrani *et al.*, 2002, Marczak *et al.*, 2003), nutritives en cultures cellulaires (Deparis *et al.*, 2003).

1.6. Les sucres et fibres de la graine.

Les glucides sont principalement localisés dans les parois cellulaires de la graine. Ainsi, ces parois sont constituées de 39 % de substances pectiques, de 29 % d'hémicellulose, de 22 % de cellulose et de 8% d'arabinogalactane (Domínguez *et al.*, 1994). De plus, la partie externe de la graine également appelée *coque* est constituée par un grand nombre de fibres et notamment de lignine. La somme globale de ces composants représente 20 à 28% du poids de la graine en fonction de la variété de colza étudiée. Les deux tableaux qui suivent (Tableau B 6 et Tableau B 7) détaillent l'ensemble des polysaccharides susceptibles d'être présents et donnent une idée de leur répartition dans la graine. Du fait de leurs propriétés physicochimiques, certains de ces polysaccharides (dégradés ou non) vont intervenir dans la stabilisation de l'interface de l'émulsion produite lors de l'extraction (*cf. Etat de l'art* 3.3.2). Il est aussi à noter que la structure particulière de ces molécules en fait des composés qui sont très stables à l'état naturel voire difficilement accessibles et hydrolysables même par des enzymes spécifiques (rapport AFSSA, 2003).

Caractérisation des constituants de la graine de colza

Tableau B-6 : Composition saccharides de la graine de colza décortiquée (% sur la base de la graine déshuilée et par rapport à la matière sèche) d'après Bell, 1984.

<i>composants</i>	<i>quantité %</i>
<i>polysaccharides totaux</i>	20-28
<i>Pectines</i>	14,5
<i>résidus cellulosiques</i>	7
<i>amyloïde (essentiellement fuco-amyloïde)</i>	4,5
<i>Arabinanes</i>	2
<i>Arabinogalactanes</i>	1
<i>saccharides de faible poids moléculaire solubles dans l'alcool à 80% *</i>	3,2

* fructose, glucose, galactose, myoinositol, saccharose, galactinol, raffinose et stachyose.

Tableau B-7 : Composition des pellicules de colza d'après Bell 1984.

<i>composants</i>	<i>pellicules (%)</i>
<i>azote libre</i>	34
<i>fibres brutes</i>	44
<i>pentosanes</i>	14,5
<i>cellulose</i>	32
<i>sucre</i>	3,8
<i>lignine</i>	12 - 24
<i>polyphénols</i>	6 - 12
<i>tannins</i>	1,5

2. Extraction de l'huile de colza.

2.1. Extraction conventionnelle de l'huile de colza.

2.1.1. Obtention de l'huile brute.

Malgré quelques évolutions techniques, le procédé industriel de trituration des graines oléagineuses n'a que très peu changé au cours des cinquante dernières années. Les principaux progrès depuis ces dix dernières années ont porté sur l'accroissement des débits (2 000 t/jour pour le colza), sur les économies d'énergie et la réduction des rejets d'hexane et d'eaux usées (Evrard, 2003). La méthode utilisée pour le traitement de la graine de colza et des matériaux ayant un fort contenu en huile est généralement décrite comme un procédé multi-étapes qui est schématisé dans la Figure B 7. De façon brève le principe peut se résumer de la façon suivante :

Après conditionnement de la graine (détaillée dans le paragraphe suivant), une étape de pré-pressage amène à la production d'huile de première pression. Cette première extraction est alors suivie par l'extraction de l'huile résiduelle du tourteau par un solvant organique (Unger, 1990 ; Carr, 1997). Le solvant de choix lors de ces extractions est l'hexane. Disponible à faible coût, il permet une extraction très efficace c'est à dire un bon recouvrement de l'huile et un bon recyclage du solvant utilisé.

Les graines de colza proviennent directement des silos de stockage. Ceci implique la présence de fragments de plantes de colza, de mauvaises herbes et d'autres matériaux étrangers qu'il est nécessaire d'enlever avant l'extraction de l'huile. On procède donc à un nettoyage préalable qui se décompose en trois étapes : l'aspiration des poudres et particules vraiment légères et deux tamisages pour enlever les particules de trop grandes et de trop petites tailles. Après cette opération qui est conduite sur un seul équipement, il reste en général moins de 2,5 % de matières étrangères dans la graine. La valorisation des particules séparées se fait essentiellement en alimentation animale.

Suite à ces traitements préliminaires, des flocons sont produits par aplatissage : passage des graines entre deux rouleaux métalliques tournant à une vitesse légèrement différente, ce qui génère un cisaillement en même temps que l'écrasement. L'opération peut être menée en deux fois, l'épaisseur finale des flocons étant de l'ordre de 0,2 à 0,3 mm. Cet écrasement permet une meilleure efficacité de l'extraction au solvant en augmentant la surface de contact avec les paillettes et en cassant les structures les moins accessibles.

Les flocons sont ensuite chauffés sur des grilles par de la vapeur, dans un cuiseur contenant 5 à 8 grilles superposées. Un bras tournant permet l'étalement régulier des flocons au sein de

Extraction et raffinage de l'huile de colza

l'appareil ainsi que d'une grille à l'autre. Cette étape de cuisson dure généralement de 20 à 40 minutes pour une température comprise entre 75 et 85°C pour un colza à faible teneur en glucosinolates (100 à 107 °C pour un colza plus riche). Chaque niveau du cuiseur est équipé d'une entrée et d'une sortie d'air, ce qui permet de pouvoir ajuster le taux d'humidité de la graine de 5 à 6,5%, humidité requise par la plupart des presses à vis. La montée en température doit être rapide afin de dénaturer le plus vite possible les enzymes thermosensibles telles que les myrosinases. Ce chauffage permet la coalescence des gouttelettes lipidiques et l'agglomération des protéines. Enfin, la réduction de la viscosité de l'huile engendrée par cette élévation de température permet une extraction plus facile de l'huile lors du pressage.

L'étape suivante, le pressage, est assurée généralement par une presse horizontale constituée d'une vis tournant dans un tambour avec une série de barres espacées ce qui permet à l'huile de sortir. Ce pressage permet d'extraire 60 à 70% de l'huile contenue dans les paillettes. De plus, le gâteau formé suite à ce traitement est plus compact que les paillettes dont il est issu, ce qui facilite l'extraction au solvant de l'huile qu'il contient. L'huile issue de la pression est pour sa part décantée et filtrée de façon à éliminer les particules solides qui représentent 7 à 15% de sa masse.

Le gâteau est quant à lui traité par l'hexane à 50-60°C par percolation à contre-courant et contient moins de 2% d'huile résiduelle et 25 à 30% d'hexane en fin d'extraction. La récupération du solvant s'effectue par évaporation (Grant *et al.*, 1983) à l'aide d'un cuiseur à une température de 103 à 107°C pendant 30 à 40 minutes. Les vapeurs de solvants sont alors recueillies et dirigées vers un étage de distillation. Le chauffage doit être dans un premier temps mené à sec pour éviter la formation d'amas protéiques imperméables, puis de la vapeur est injectée en fin de cuisson. Le tourteau ainsi obtenu contient environ 15 à 18% d'humidité. Il doit donc être refroidi et séché avant conditionnement.

La phase huileuse, issue de l'extraction, est débarrassée de l'hexane par distillation correspondant à trois étapes de concentration. L'huile est d'abord concentrée jusqu'à une teneur de 65% grâce à l'énergie récupérée par les vapeurs chaudes provenant de l'installation d'extraction du solvant résiduel du tourteau. La seconde étape de concentration laisse 5% d'hexane dans l'huile, tandis que le solvant résiduel est finalement extrait sous vide jusqu'à une concentration inférieure à 1000 ppm. Les pertes de solvant sont inférieures à 3 litres d'hexane par tonne de graines traitées, mais la législation va dans le sens d'une restriction de ce type de consommation (Denise, 1998).

L'huile brute résultant des extractions ne peut être conservée en l'état en raison d'une forte teneur en impuretés (ions, eau, phospholipides, pigments chlorophylliens, acides gras libres,

Extraction et raffinage de l'huile de colza

hexane résiduel) qui limitent parfois la stabilité de l'huile extraite. Dans le cas d'huile à destination alimentaire, ces composés donnent de surcroît des goûts désagréables et les produits d'oxydation terminaux générés lors de la conservation sont, pour leur part, toxiques. S'ensuivent alors les étapes de raffinage chimique ou physique des huiles brutes (Unger, 1990 ; Denise, 1998 ; Carr, 1997).

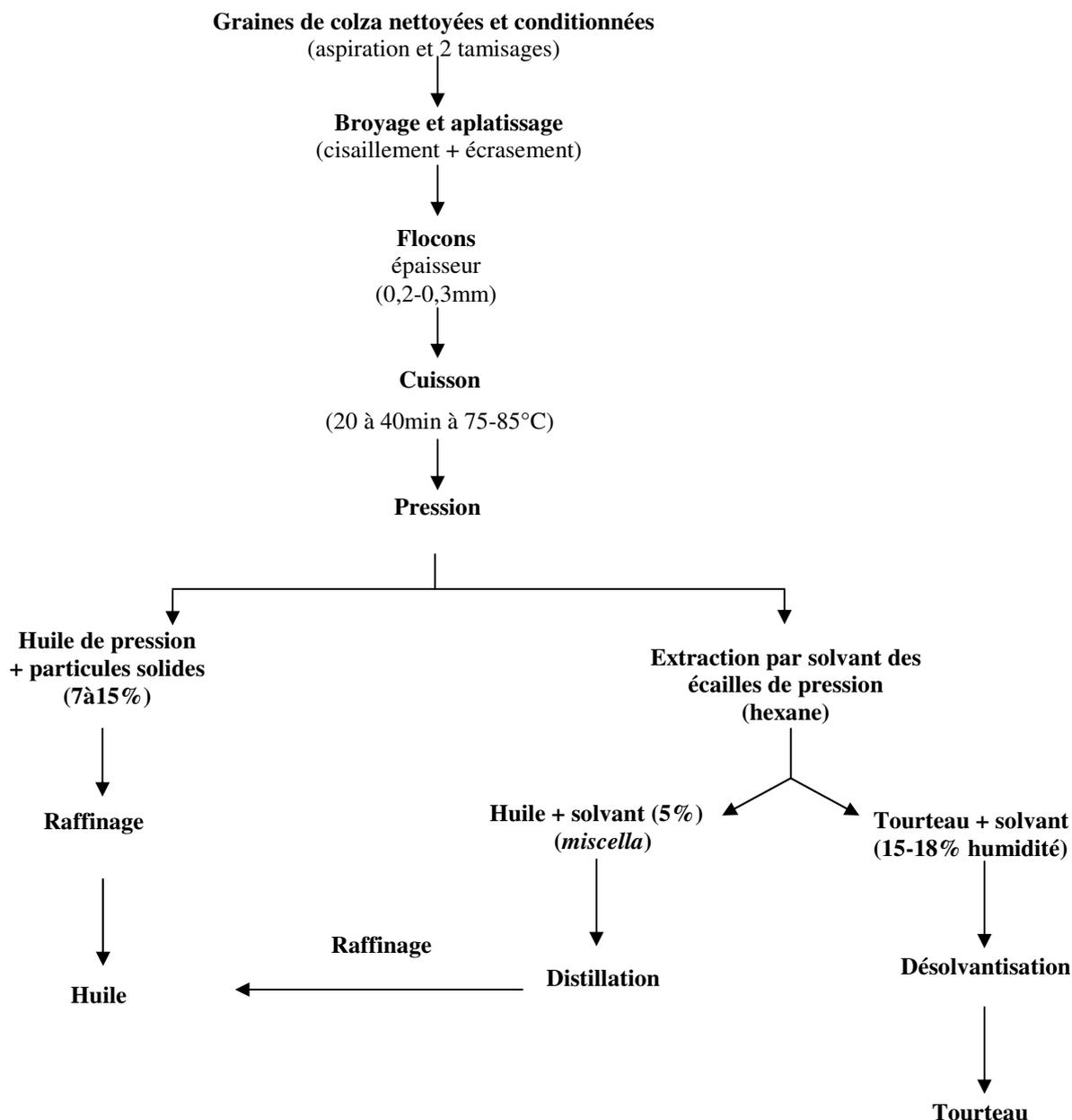


Figure B-7 : Schéma de l'extraction conventionnelle de l'huile de colza à l'aide de solvants organiques d'après Bernardini, 1973 ; Mustakas *et al.*, 1980, Evrard, 2003.

*Extraction et raffinage de l'huile de colza**2.1.2. Le raffinage de l'huile.*

Le raffinage des huiles est le procédé employé afin d'obtenir une huile d'aspect attirant, au goût neutre, et résistante à l'oxydation.

Parmi les composants non glycéridiques de l'huile, certains sont loin d'être indésirables (caroténoïdes, tocophérols et certains stérols), alors que d'autres constituants doivent être éliminés. Le raffinage est l'opération qui permet l'élimination des composés non triglycéridiques délétères de l'huile brute, à savoir les phospholipides, les acides gras libres, les pigments (chlorophylles), les composés odorants (aldéhydes et cétones responsables de l'odeur et du goût), les cires, les composés d'oxydation, les composés soufrés et les métaux (Mag, T.K., 1983 ; Gibon et Tirtiaux, 1998 ; Bhosle et Subramanian, 2005) et les résidus phytosanitaires. Aux Etats unis, le terme de raffinage s'applique uniquement aux opérations de prétraitement et de désacidification ou neutralisation, tandis que dans la plupart des autres pays ce terme inclut le blanchiment (ou décoloration) et la désodorisation. L'ensemble de ces étapes dites de raffinage permet d'obtenir un produit comestible (Anderson, 1953).

Selon Mag, 1983, la répartition de l'huile de canola brute en composés à éliminer est la suivante :

- acides gras libres : 0,4-1% de l'huile totale,
- phospholipides : jusqu'à 3,5% de l'huile totale pour l'huile brute,
- chlorophylles : 5-25 ppm,
- soufre 3-15 ppm.

Les deux principales méthodes de purification sont le raffinage chimique et le raffinage physique.

Lors du raffinage chimique, les acides gras libres, une partie des phospholipides et d'autres impuretés sont soustraits pendant une phase appelée phase de neutralisation à l'aide de composés alcalins (généralement la soude caustique). Ce procédé a pour désavantage une forte perte en huile neutre et la formation de savons ou « soapstocks » importants, notamment dans le cas d'huiles très acides. Par opposition, lors du raffinage physique les acides gras libres sont entraînés par distillation durant la phase de désodorisation (O'Brien et O'Brien, 2003), mais les phospholipides et autres impuretés doivent être écartés de façon préalable à l'ajout de vapeur afin d'obtenir des résultats satisfaisant en termes de qualité. Les travaux de Hefter, (1905) et Wecker, (1924), montrant la possibilité de désacidifier l'huile à haute température avec de la vapeur d'eau, sont à la base du procédé de raffinage physique.

Extraction et raffinage de l'huile de colza

Depuis quelques années, un certain nombre de méthodes assimilées à un raffinage physique se sont développées à l'échelle laboratoire sans pour autant être passées à l'échelle industrielle. Il s'agit :

- de la déacidification biologique : utilisation de microorganismes assimilant les acides gras libres de l'huile en vue de leur croissance (Cho *et al.*, 1990) ou utilisation de lipases synthétisant des triacylglycérols à partir de trois acides gras libres.
- la ré-estérification chimique : réestérification des acides gras libres sur le glycérol à température élevée, sous atmosphère inerte, avec ou sans ajout de catalyseur.
- l'extraction par solvant : exploitation de la solubilité préférentielle des acides gras libres par rapport aux triacylglycérols dans certains solvants.
- L'extraction par fluide supercritique : L'utilisation de CO₂ supercritique a prouvé son efficacité dans la déacidification des huiles à fort contenu en AGL. Ce procédé s'effectue à basse température, à l'aide d'un solvant inerte et permet une séparation sélective. Cependant son utilisation reste limitée du fait de l'investissement élevé qu'il nécessite, et n'est rentable que pour des composés glycéridiques à forte valeur ajoutée.
- Le raffinage par vapeur de gaz inerte : C'est un procédé dans lequel la vapeur est remplacée par un inerte tel que l'azote. Ce process a pour avantage de limiter l'entraînement des tryglycérides, de la fraction insaponifiable et limite les risques d'oxydation des acides gras polyinsaturés. (Ruiz-Mendez *et al.*, 1996)
- le raffinage par techniques membranaires : Du fait de leur caractère non polluant et de leur faible consommation en énergie, les techniques membranaires devraient trouver leur place lors du raffinage. C'est Sen Gupta en 1977, qui le premier, introduit les membranes lors de l'étape de dégommeage. Aujourd'hui de nombreux travaux, étudient la faculté de ces dernières à remplacer les techniques traditionnelles dans toutes les étapes du raffinage : dégommeage, désacidification, blanchiment, décirage. Toutefois un certain nombre de paramètres limite leur utilisation : le colmatage et leur instabilité dans le temps (perte de la fonction de sélectivité). L'accent à l'heure actuelle doit donc être mis sur l'adaptabilité des membranes en milieu lipidique et leur utilisation en milieu industriel.

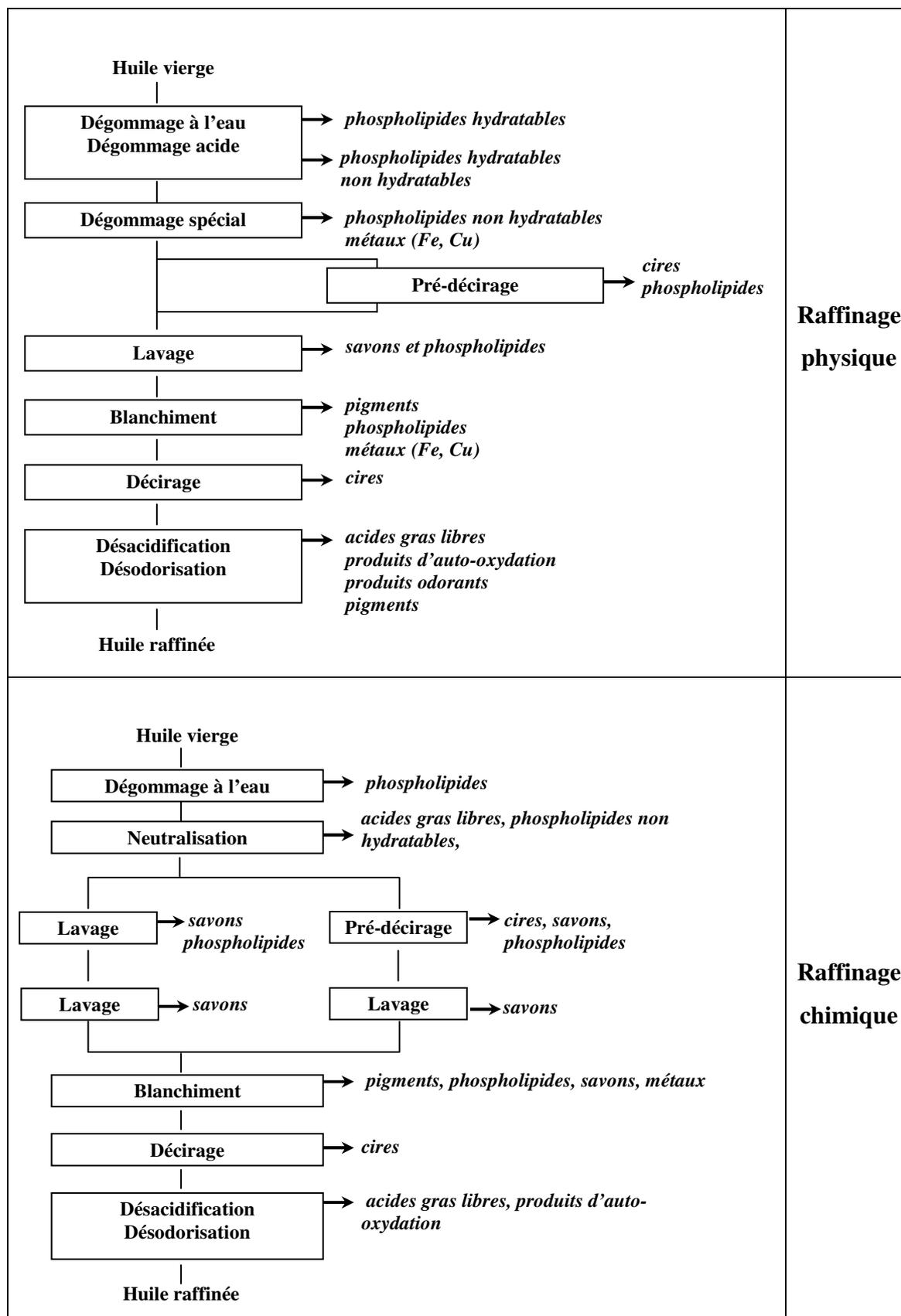
Dans le cas du colza, les deux raffinages (chimique ou physique) peuvent être appliqués et ce en fonction du coût du procédé et des installations nécessaires en vue du traitement des savons et des effluents aqueux lors du raffinage chimique (Čmolík *et al.*, 2000 ; O'Brien et O'Brien, 2003). L'étude de Čmolík *et al.*, 2000 a permis de comparer la qualité de l'huile de colza après raffinage physique et chimique à une échelle pilote. Aucune

Extraction et raffinage de l'huile de colza

différence substantielle n'a été observée tant au niveau de la qualité sensorielle qu'au niveau de la stabilité à l'oxydation sur des huiles raffinées et ce après une conservation de 12 mois à 15°C. Le Tableau B 8 reprend l'ensemble des étapes et différencie les deux types de procédés de raffinage.

Extraction et raffinage de l'huile de colza

Tableau B-8 : Comparaison des étapes des deux principaux procédés de raffinage des huiles végétales (raffinages physiques et chimiques) d'après Kovári, 2004.



L'ensemble des étapes du raffinage sont détaillées dans les paragraphes qui suivent dans l'ordre de réalisation.

✓ **Le dégommeage.**

Préalablement au raffinage physique ou chimique, une étape de dégommeage est nécessaire afin de soustraire à l'huile brute l'ensemble des phospholipides hydratables ou non hydratables. En présence de ces composés, les étapes ultérieures du raffinage seront moins performantes, voire impossibles. En effet, une huile raffinée mal débarrassée de ses phospholipides s'acidifie, s'oxyde et développe rapidement un goût désagréable. De plus, une élimination incomplète des composés phosphorés peut avoir pour conséquence de créer un certain nombre de difficultés dans les étapes ultérieures de raffinage (désactivation des terres décolorantes, colmatage des filtres, inhibition de la décoloration thermique et de la désodorisation) (Gibon et Tirtiaux, 1998). Il est donc nécessaire de « dégommer » les huiles brutes avant toute opération de raffinage jusqu'à des teneurs résiduelles en phosphore inférieures à 10 ppm afin d'optimiser les étapes subséquentes.

Un simple traitement à l'eau suffit pour extraire les phospholipides hydratables des huiles, on parle alors de dégommeage à l'eau.

La grande avancée des années 1980 concernant le dégommeage a été l'utilisation d'acides organiques en vue du dégommeage des phospholipides non hydratables. Les phospholipides non hydratables sont présents dans l'huile sous la forme de sels de calcium (Ca) ou de magnésium (Mg) des acides phosphatidiques. L'ajout d'acides minéraux ou organiques (acide phosphorique, citrique ou acide éthylènediamine tétracétique (EDTA)) ayant des propriétés complexantes (chélatantes) des cations métalliques ou non, permet la libération du calcium et du magnésium, facilitant l'hydratation des phospholipides et leur élimination dans la phase aqueuse (Nilsson-Johansson *et al.*, 1998, Gibon et Tirtiaux, 1998).

Les avancées techniques récentes ont permis l'optimisation de ces procédés de dégommeage via l'utilisation d'étapes permettant la limitation des effluents aqueux et facilitant la séparation des phospholipides hydratés. Plus récemment, des méthodes alternatives ont été développées nécessitant soit l'emploi d'enzymes, soit l'utilisation de membranes semi sélectives. Toutefois, l'utilisation des membranes à ces fins n'en est qu'à ses débuts et il serait nécessaire de développer nos connaissances :

- i) des huiles brutes que l'on pourrait assimiler à un milieu colloïdal complexe,

Extraction et raffinage de l'huile de colza

- ii) des interactions moléculaires entre les multiples composants de cette huile et la membrane afin d'en faciliter l'optimisation d'un point de vue physicochimique et donc faciliter son industrialisation (Pioch *et al.*, 1998).

Le Tableau B 9 reprend l'ensemble des méthodes utilisées ou les procédés en cours de développement en vue du dégomme des huiles brutes.

Tableau B-9 : Les différents procédés de dégomme préalable au raffinage physique des huiles végétales d'après Čmolík et Pokorný, 2000 ; Gibon et Tirtiaux, 1998 .

<i>procédé de dégomme</i>	<i>principe de la procédure</i>	<i>résultat : (teneur résiduelle en phospholipides, ppm)</i>	<i>références</i>
<i>dégomme à l'eau</i>	Traitement de l'huile brute avec de l'eau chaude	Elimination des phospholipides hydratables	
<i>dégomme acide</i>	Traitement de l'huile brute avec de l'acide phosphorique ou citrique	<50ppm	Segers et Van de Sande (1982): Super degumming, (Unilever) Diosady <i>et al.</i> , 1984
<i>raffinage acide ou dégomme acido-basique</i>	L'huile brute est dégomme à l'eau, traitée avec un acide puis partiellement neutralisée à la soude	< 10ppm	Nilsson-Johansson , (1988) : Special degumming, (Alffa-laval) Van de Sande et Segers (1989) : Uni degumming, (Unilever)
<i>dégomme à sec</i>	L'huile brute est dégomme à l'aide d'acide (EDTA, Acide citrique, phosphorique) avec de très petites quantités d'eau puis l'étape de blanchiment est combinée	0,8-7,8 ppm	Gibon et Tirtiaux, 1998 : Soft degumming
<i>dégomme enzymatique</i>	Les phospholipides sont modifiés enzymatiquement (lyso-phospholipides) de façon à les rendre non-liposolubles	< 10ppm	Clausen (2001), Dahlke, (1999) ; Enzymax, (Lurgi Öl Gas Chemie)
<i>dégomme par membrane</i>	L'huile brute est passée à travers une membrane semi-perméable qui retient les phospholipides (après désolvantation)	< 10ppm	Subramanian et Nakajima, (1997) Koris et Vatai, (2002) : Creol, Krupp

✓ La neutralisation.

La neutralisation est une étape spécifique et prépondérante du raffinage chimique. Si une huile est mal neutralisée, les étapes ultérieures (décoloration, décirage) du raffinage s'en trouvent affectées (Johnson, 2002). Pendant cette étape, la neutralisation est réalisée généralement par addition de soude caustique qui va réagir avec les acides gras libres et former alors des savons encore appelés « soapstocks » et de l'eau. La neutralisation doit être

réalisée de façon adéquate car dans le cas contraire, certains des triacylglycérols peuvent être saponifiés par la soude, augmentant ainsi les pertes en huile neutre donc le rendement global du raffinage. L'ajout de substances neutralisantes doit donc être réalisé avec parcimonie même si l'emploi d'un excès de soude favorise les étapes de décoloration et de désodorisation (Allen, 1997). Cette étape de neutralisation est alors suivie d'étapes de lavage et de centrifugation permettant la séparation des composés saponifiés formés et de l'huile. Toutefois, la centrifugation conduit à une perte non négligeable en triglycérides notamment pour les huiles hyperacides (>5% Acides gras libres) ce qui rend son utilisation impossible sur de telles huiles.

✓ **La décoloration.**

Quelque soit le type de raffinage la décoloration des huiles doit être réalisée. Le but premier de la décoloration est d'améliorer la couleur de l'huile en enlevant les pigments par ajout d'argiles naturelles, de terres activées, de silicates synthétiques, de gels de silice, ou de charbon noir. D'autres avantages de la décoloration sont l'élimination des traces de phospholipides et de savons résiduels ainsi que la rupture des peroxydes (Johnson, 2002).

✓ **La désodorisation.**

La désodorisation a pour but d'améliorer le goût, la couleur, l'odeur et la stabilité des huiles. De plus, elle permet d'éliminer certains composés volatiles de contamination. Lors du raffinage physique, cette étape encore appelée distillation neutralisante conduit à l'emploi de vapeur à haute pression et permet à la fois la déstructuration des pigments contenus dans l'huile et l'élimination des acides gras libres (Chu et Hwang, 2002). Cependant, mal maîtrisée, c'est l'étape la plus dénaturante pour l'huile. Elle permet alors l'apport de l'énergie nécessaire pour faire, entre autre, passer les insaturations de la configuration *cis* à la configuration *trans*.

Toutes les étapes constituant le raffinage ont un coût important et produisent des effluents qu'il est nécessaire de retraiter avant élimination. Des procédés d'extraction alternatifs de l'huile conduisant à une huile de qualité sont donc en cours de développement afin de minimiser les coûts engendrés par ces méthodes d'extraction et de raffinage.

2.2. Méthodes alternatives de production de l'huile de colza.

2.2.1. Recherche de solvants et de procédés d'extraction « alternatifs ».

L'hexane, solvant préférentiellement utilisé pour l'extraction des huiles végétales, est de plus en plus contesté en raison de sa toxicité sur le système nerveux (Galvin, 1997) et de son inflammabilité. Face à ce constat, la recherche d'alternatives s'est puissamment organisée dans 2 directions : soit l'utilisation de solvants de substitution,

soit plus largement des procédés d'extraction totalement novateurs n'incluant pas d'étape d'épuisement par solvant organique.

Actuellement, un isomère de l'hexane, l'isohexane, qui n'est pas considéré comme un polluant atmosphérique dangereux, supplante partiellement l'hexane dans les huileries nord-américaines (Inform, 2002). Dans les années 60, le remplacement de l'hexane par l'acétone a été envisagé. Toutefois, la miscibilité de l'eau et de ce solvant limite l'extraction de l'huile et implique une étape de retraitement du solvant avant recyclage, si bien qu'aucune application industrielle rentable n'a vu le jour (Hron, 1997 ; Wakelyn *et al.*, 2001).

D'autres solvants tels que les alcools à courtes chaînes comme l'éthanol ont été étudiés. Toutefois, l'analyse des coûts montre que ces solvants ne sont pas compétitifs en dépit de leur innocuité (Rao et Arnold, 1956 ; Hron *et al.*, 1994 ; Lusas-Hernandez, 1997).

Un procédé a par ailleurs été développé par la société Westfalia separator AG (brevet allemand : DE 19529795) : Friolex[®]. Ce procédé physique utilise l'eau et fait intervenir un décanteur centrifuge ainsi que des agents alcooliques (5 à 75% du poids du produit en fonction du produit à extraire). Il donne des rendements équivalents à ceux d'une extraction à l'hexane avec une qualité de l'huile comparable à celle de l'huile brute (voire une teneur en phosphore équivalente à celle d'une huile raffinée taux de phosphore (mg/kg) : < 2,5), mais aucune donnée économique n'est disponible à ce jour (Hruschka et Frische, 1998). Ces travaux ne paraissent encore développés récemment qu'au stade pilote (Evrard, 2003).

L'utilisation de gaz supercritiques a également été envisagée. Ces techniques font généralement appel au CO₂ supercritique et nécessitent des pressions élevées et des températures modérées (King, 1997 ; Perrut, 1999). Cependant, elles imposent un investissement considérable pour des coûts de production supérieurs à ceux de l'extraction à l'hexane. Ceci donne peu de chance à de telles méthodes pour aboutir à une utilisation à l'échelle commerciale pour des produits à faible valeur ajoutée.

*Extraction et raffinage de l'huile de colza**2.2.2. Le procédé d'extraction par voie aqueuse.*

Une des voies explorée pour limiter l'usage de l'hexane est le procédé d'extraction par voie aqueuse (PEA). Apparu dans les années 50, il permet la récupération simultanée de l'huile et des protéines sous forme de concentrat ou d'isolat. Contrairement aux méthodes utilisant des solvants organiques, il joue non pas sur la dissolution de l'huile, mais sur l'immiscibilité huile - eau. Après mise en suspension de l'huile dans l'eau, la théorie voudrait qu'il y ait démixtion de phase compte tenu de l'instabilité thermodynamique du mélange. Le procédé type est basé sur la méthode de flottation à l'eau chaude utilisée pour l'extraction de l'huile des tourteaux en milieu rural (Rosenthal, 1996). Elle est réalisée en cinq étapes principales :

- 1) le conditionnement en température des graines,
- 2) le broyage,
- 3) l'extraction de l'huile par de l'eau bouillante,
- 4) la récupération de l'huile
- 5) le séchage.

Les graines broyées sont donc portées à ébullition dans l'eau, ce qui permet théoriquement la libération de l'huile à la surface de la phase aqueuse. Toutefois, la production d'une émulsion stable huile dans l'eau, liée notamment à la présence d'agents tensioactifs tels que les phospholipides, les glycolipides ou les protéines, rend cette opération moins simple qu'il n'y paraît. De plus, la structure complexe de la graine est une barrière à la pénétration de l'eau. Et enfin, la composition physico-chimique de la graine implique qu'un grand nombre de paramètres vont influencer sur les rendements d'une telle extraction directe qui s'avèrent globalement assez faible (Rosenthal *et al.*, 1996).

Les principaux paramètres influençant ce rendement sont les suivants : la finesse du broyage et sa réalisation (broyage à sec ou humide), la température, le pH et le ratio solide/eau lors de l'extraction. Une étude menée par Embong et Jelen en 1977 a montré que les conditions optimales pour l'extraction de l'huile de colza lors d'un tel procédé étaient les suivantes : température 70-75°C, temps d'extraction : 60 min, ratio graines / eau : 1 : 3-4, et pH 6,6. Cette approche conduirait à un rendement en huile de 90%, aucune donnée n'est disponible sur le rendement de l'extraction protéique.

L'un des problèmes posé par les PEA est la déstabilisation de l'émulsion engendrée au cours du procédé. Le paragraphe A 3.7 traitera en détail de ce point essentiel.

L'optimisation d'un tel procédé doit donc forcément passer par l'étude de l'émulsion. Elle doit être parfaitement caractérisée afin d'être déstabilisée et obtenir ainsi un rendement maximum en huile et co-produits.

*Extraction et raffinage de l'huile de colza**2.2.3. Extraction aqueuse assistée par des enzymes.*

En dépit de leurs avantages sur le plan environnemental et sanitaire, il est souvent reproché aux PEA des huiles végétales un manque d'efficacité en termes de rendement direct en huile. Ces performances insuffisantes seraient liées à la présence de structures cellulaires persistantes qui emprisonneraient de l'huile résiduelle dans la matrice protéagineuse, que seul un puissant solvant apolaire permet d'extraire quantitativement (Hanmoungjai *et al.*, 2001 ; Abdulkarim *et al.*, 2005). En réponse à ce problème, des méthodes faisant intervenir des enzymes ont été développées. Ces protéines sont d'activité et de nature diverses (protéases ou polysaccharides hydrolases) et deviennent alors des auxiliaires de déstructuration des parois cellulaires des tissus oléagineux, en association avec le traitement physique de broyage. Le procédé étant quasiment identique à celui de l'extraction aqueuse (outre une phase d'hydrolyse enzymatique), il pose les mêmes exigences que les PEA.

La plupart des études menées sur le colza en utilisant des enzymes ont été réalisées sur le tourteau déshuilé, afin d'en améliorer les qualités digestives. Dans d'autres cas, elles ont été utilisées en tant qu'assistants technologiques d'extraction par les solvants organiques (Sosulski *et al.*, 1988). Toutefois, bon nombre d'études menées sur des substrats divers tels que le soja (Adler-Nissen, 1986 ; Olsen, 1988 ; Yoon *et al.*, 1991), le maïs (Bocevaska *et al.*, 1993), l'olive (Fantozzi *et al.*, 1977 ; Ranalli et Martenilli, 1994), la noix de coco (Mac Glone *et al.*, 1986 ; Christensen, 1989 ; Barrios *et al.*, 1990), l'avocat (Buenrostro et Lopez-Mungia, 1986 ; Freitas *et al.*, 1993), le tournesol (Lanzani *et al.*, 1975 ; Domínguez *et al.*, 1995), ou le palmier (Cheah *et al.*, 1990) traitent de ce sujet et parviennent à des rendements plus que satisfaisants.

L'ensemble de ces travaux montre clairement qu'il n'existe pas de règle en ce qui concerne la ou les activités enzymatiques et les conditions opératoires à employer. Cette hétérogénéité est à relier aux propriétés structurales et physicochimiques du substrat utilisé ainsi qu'à la nature des enzymes employées. Malgré tout, une tendance semble se dégager : l'emploi de complexes multi-enzymatiques, qui donne en général de meilleurs résultats qu'une enzyme individuelle (Lanzani *et al.*, 1975 ; Olsen, 1988 ; Barrios *et al.*, 1990 ; Yoon *et al.*, 1991). De plus, des études portant sur le colza (Lanzani *et al.*, 1975 ; Olsen, 1988 ; Olsen, 1994) ou d'autres substrats semblent très prometteuses et affichent un rendement en huile pouvant aller jusqu'à 90 %.

Un grand nombre de paramètres doit toutefois être optimisé lors de telles extractions : la nature des enzymes utilisées, la température, le pH et la concentration en enzyme lors de l'hydrolyse ainsi que tous les paramètres des PEA (méthode et finesse de broyage, pH d'extraction de l'huile, ratio solide / eau).

Extraction et raffinage de l'huile de colza

Le Tableau B 10 présente l'ensemble des publications sur le colza et la nature des enzymes utilisées. Quant à la Figure B 8, elle rend compte du procédé et fait le point sur l'ensemble des paramètres à régler.

Tableau B-10 : Bilan des extractions enzymatiques sur les graines de colza.

<i>température (°C)</i>	<i>enzyme</i>	<i>temps (h)</i>	<i>rendement d'extraction</i>	<i>références</i>
40-50-65	protéase	3	74 % huile totale	Lanzani <i>et al.</i> , (1975)
40-50-60	Protéase pectinase	3	78 % huile totale	Lanzani <i>et al.</i> , (1975)
50-63	α amylase β glucanase protéase	3	72 % huile totale	Fullbrook, (1983)
50-63	hémicellulase	3	75 % huile totale	Fullbrook, (1983)
50	multiactivité	12	43% M.S.	Sosulski <i>et al.</i> , (1988)*
50	pectinase	12	39 % M.S.	Sosulski <i>et al.</i> , (1988)*
45-50	multiactivité	6	nd	Sosulski et Sosulski (1990)
50	multiactivité	4	nd	Olsen, (1988)
nd	multiactivité	nd	80 % huile totale	Deng <i>et al.</i> , (1992)

Avec % M. S. : Pourcentage de matière sèche et nd : non déterminé

* : les rendements sont calculés après une extraction à l'hexane de sept heures du milieu séché et hydrolysé.

Extraction et raffinage de l'huile de colza

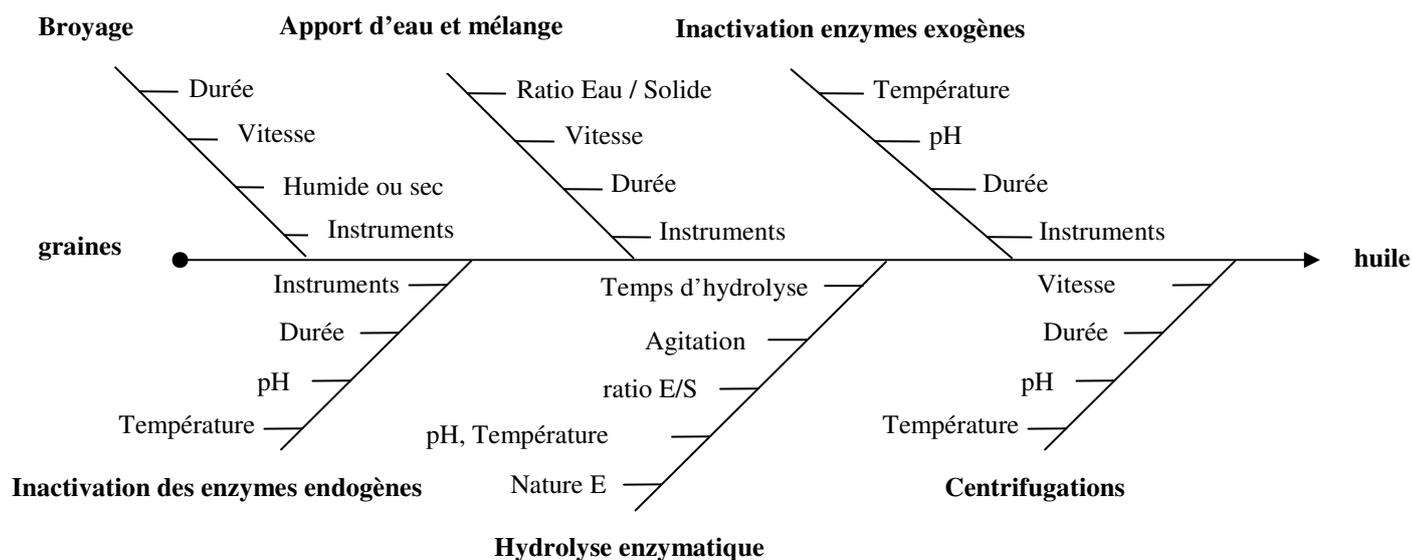


Figure B-8 : Schéma de l'extraction par voie enzymatique : paramètres à ajuster.
avec E : enzyme et S : substrat

L'optimisation de ce procédé tant en coût et rentabilité qu'en performance technique exprimée en rendement en huile, est donc un travail particulièrement intéressant pour la filière. Outre la production d'une huile de qualité, il permettrait la valorisation des coproduits en favorisant la dégradation du pool azoté par voie enzymatique.

3. Les émulsions d'huile dans l'eau (H/E).

La diversité de composition de la graine et les modifications de propriétés physicochimiques lors du procédé technologique implique la création d'un système très complexe avec la formation d'une émulsion lors du procédé technologique employé au cours du présent travail. L'exploitation de systèmes modèles et un retour aux principes de base sont appropriés pour permettre une bonne compréhension des forces et mécanismes pouvant intervenir dans la stabilité des émulsions.

Dans cette partie, les lois fondamentales régissant la stabilité des émulsions, les différents mécanismes de déstabilisation, les paramètres influençant la stabilité de celles-ci et les méthodes permettant de les caractériser seront détaillés. Ceci permettra d'obtenir une vue globale n'excluant alors aucune possibilité qui serait à même de servir le but ultime des travaux effectués : la démixtion de l'émulsion après la libération de l'huile contenue dans les graines.

3.1. Définition.

Les dispersions peuvent être de deux types soit solide/liquide (suspension), soit liquide/liquide (émulsion). L'émulsion apparaît alors comme un cas particulier de dispersion entre deux liquides non miscibles. Elle est soumise aux lois d'interaction régissant les dispersions. De façon générale, elle est définie comme la coexistence de deux liquides immiscibles dans un même système (généralement l'huile et l'eau) avec l'un des deux liquides dispersé sous forme de petites gouttes dans l'autre liquide. Dans la plupart des produits alimentaires, la taille des gouttes est de 0,1 à 100 μ m (Dickinson et Stainby, 1982 ; Dickinson, 1992a ; Dalgleish, 2003).

Les émulsions peuvent être classées en fonction de la distribution de la phase huileuse et de la phase aqueuse. Lorsque les gouttes dispersées (phase dispersée ou interne) sont constituées d'huile en phase aqueuse (phase continue ou externe) on parle d'émulsion huile-dans-l'eau (H/E). A l'inverse, lorsque la phase dispersée est l'eau et que la phase continue est l'huile on parle d'émulsion eau-dans-l'huile (E/H). Les constituants de l'émulsion sont alors répartis entre l'huile, l'eau et les régions interfaciales et ce, en fonction de leur concentration et des interactions avec l'environnement local (Figure B 9).

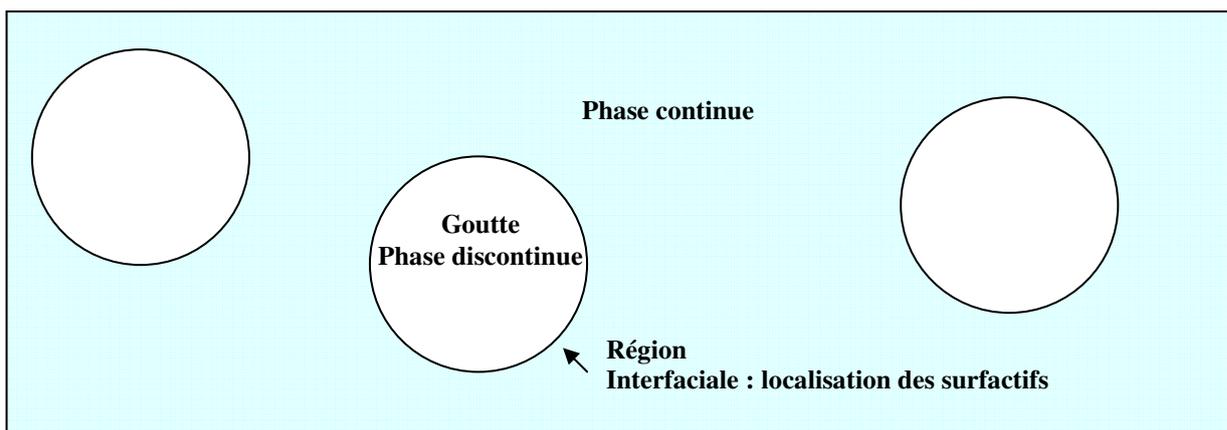


Figure B-9 : Représentation schématique de la localisation des phases dans une émulsion.

3.2. Aspects énergétiques et ordres de grandeur : Non miscibilité et énergie interfaciale - Pression de Laplace.

Les suspensions et les émulsions ont en commun que l'aire interfaciale engendrée par la production d'émulsion (émulsification) ou la comminution (réduction de la dimension des fragments d'un solide, synonyme : fragmentation) résulte en une subdivision de la phase dispersée en plus petites sous unités (Figure B 10). L'ensemble des états de dispersion et émulsion peut être décrit en termes de courbes d'énergie de distance. Une appréciation de la différence entre stabilité thermodynamique et stabilité cinétique de tels systèmes est cruciale pour une bonne compréhension des propriétés des émulsions (Dickinson, 1992a).

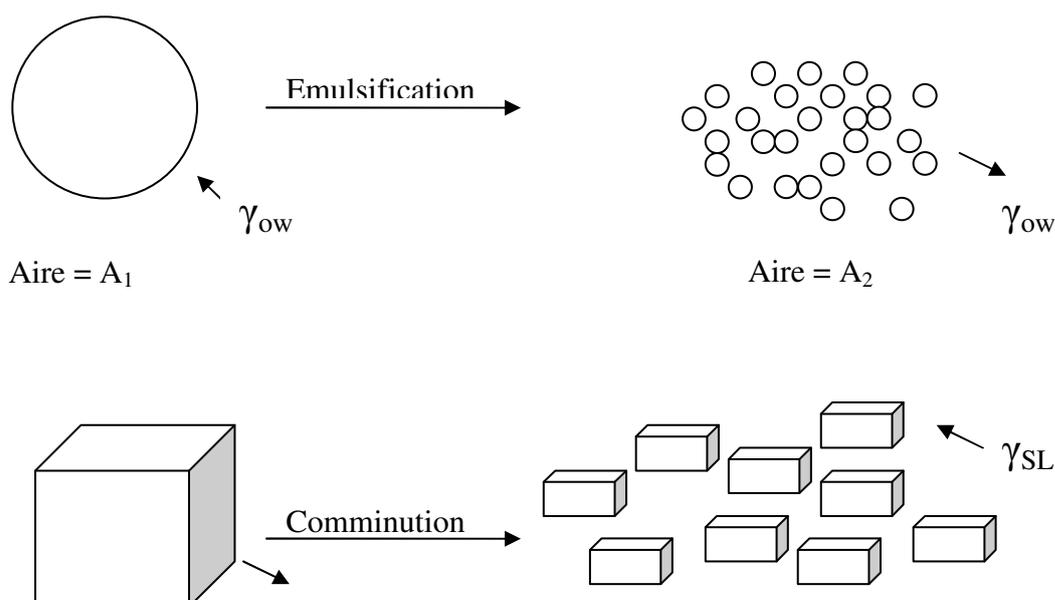


Figure B-10 : Représentation schématique de la surface engendrée lors des procédés de production d'émulsion ou de fractionnement d'après Tadros, 1989.

3.3. Emulsifiants : nature et rôle.

Du fait de l'instabilité cinétique des émulsions, il est habituellement nécessaire d'ajouter des adjuvants qui par leurs propriétés physicochimiques vont stabiliser les gouttes engendrées lors de la formation de l'émulsion.

Ces molécules sont appelées émulsifiants et font partie de la famille chimique des tensioactifs ou surfactifs (transposition du mot anglais *surfactant* qui est la compression de « *surface active agent* » : agent de surface actif) dont le rôle est plus large (détergents, agents mouillant, moussant, dispersant et émulsifiant). Elles sont généralement de nature amphiphile ce qui va leur permettre de s'adsorber à l'interface des deux phases non miscibles. La stabilisation engendrée est alors liée à la capacité de ces dernières à réduire la tension interfaciale (γ_{SL}) entre la phase hydrophobe et la phase hydrophile, minimisant ainsi la quantité d'énergie nécessaire pour déformer et perturber cette surface, par exemple par modification de la taille des gouttes (Fiechter, 1992). De plus, elles forment une couche protectrice autour des gouttes, ce qui les empêche de coalescer.

Ceci s'explique de la façon suivante :

L'activité de surface d'une molécule correspond à sa capacité à s'accumuler à une interface. Les molécules tendent à s'accumuler à l'interface quand l'énergie libre du stade adsorbé est significativement inférieure à celui de l'état non adsorbé (Hiemenz, 1986). La différence d'énergie libre entre les états adsorbés et non adsorbés (ΔG_{ads}) est déterminée par le changement des énergies d'interaction des molécules impliquées ainsi que par de multiples effets entropiques (Shaw, 1980). L'adsorption engendre un changement des énergies d'interactions qui a deux origines :

Tout d'abord, l'émulsifiant s'adsorbant à une interface huile-eau, le contact direct entre les molécules d'huile et d'eau disparaît au profit de 2 nouveaux phénomènes de contact:

- un contact entre les segments non polaires de l'émulsifiant et les molécules d'huile,
- un contact des parties polaires de l'émulsifiant avec les molécules d'eau (Israelachvili, 1992).

Ces interactions sont alors énergétiquement plus favorables que les interactions directes huile-eau. De plus, comme les émulsifiants possèdent deux parties distinctes (polaire et non polaire), leur dispersion dans la masse du système est défavorisée par le fait qu'elle entraînerait un contact de leur partie apolaire avec l'eau. Ceci est énergétiquement défavorable, d'où leur tendance à se localiser au niveau de l'interface.

Les tensioactifs sont classés en deux grands groupes : ioniques ou non ioniques.

Les tensioactifs non ioniques ne possédant pas de charge électrique en milieu aqueux, les forces de nature stérique contrôlent alors les effets d'interface. La stabilité thermodynamique des particules dispersées en est favorisée et augmente avec l'épaisseur de la couche de protection. Ces agents stabilisent les gouttes de l'émulsion vis à vis de la floculation par une combinaison de phénomènes (hydratation, fluctuation thermique ou encombrement stérique) qui impliquent la formation de liaisons spécifiques.

Les membranes formées sont généralement instables à la rupture quand les gouttes sont proches les unes des autres. La déstabilisation de l'émulsion peut alors avoir lieu par altération des propriétés de cette « membrane » et prolongation du contact entre les gouttes. Ceci peut-être une des conséquences de l'augmentation de la température du milieu lors d'un traitement thermique.

En effet, la tête polaire du surfactif se trouve déshydratée, ce qui réduit la répulsion entre les gouttes et permet le rapprochement.

De plus la courbure optimale de la couche de surfactif tend vers 0 quand la taille de la tête polaire décroît, ce qui augmente la probabilité de coalescence (McClements, 1999).

La composition et la structure de la couche adsorbée qui entoure les gouttes est fondamentale pour la stabilité des émulsions huile dans l'eau et de façon plus générale pour la stabilité des émulsions au cours des procédés d'extraction.

On ne doit pourtant pas dépasser certaines concentrations limites, faute de quoi, la molécule non ionique devient trop hydrosoluble et ses propriétés émulsionnantes et stabilisantes sont sensiblement réduites.

Dans le cas des laits végétaux, le milieu étant très complexe, on ne peut donner une liste exhaustive des surfactifs potentiels. Toutefois, les paragraphes qui suivent décrivent brièvement la nature des émulsifiants présents à l'interface et permettent de mieux comprendre les mécanismes concourant à la stabilité du système dispersé.

3.3.1. *Protéines et peptides*

Les protéines sont connues pour être des molécules douées de propriétés fonctionnelles impliquées dans des phénomènes tel que la formation de gels, la capacité à produire des émulsions ou à mousser (Panyam et Kilara, 1996 ; Bos et Vliet, 2001 ; Tesch et Schubert, 2002 ; Rampon *et al.*, 2001, 2003 a et b et 2004 ; McClements, 2004)

De par leurs propriétés amphiphiles, ces agents réduisent la tension interfaciale entre l'huile et l'eau, facilitant ainsi la formation des gouttes. C'est par leur adsorption et la création d'un film viscoélastique à l'interface entre l'eau et la gouttelette d'huile qu'elles permettent donc

la production d'émulsions stables, en protégeant les gouttes de l'agrégation et de la coalescence (Van Aken *et al.*, 2003a ; Rampon *et al.*, 2003a et 2004 ; Wilde *et al.*, 2004,).

Le comportement caractéristique des protéines, comme l'agrégation et la formation de liaisons chimiques et physiques entre les protéines adsorbées à l'interface (Boncheva et Vogel, 1997), les différencie du comportement plus classique des surfactifs de faible poids moléculaire et des polyélectrolytes. Elles adoptent alors un comportement spécifique lié à la formation d'un film adsorbé, à son vieillissement et des transitions de type glissement – collage. De ce fait, l'interface formée est connue pour être plus stable qu'en présence de polyélectrolytes de petite taille (Van Aken *et al.*, 2003a, Nakamura *et al.* , 2004).

De nombreuses études visent à étudier le mode d'interaction et le comportement de différents types de protéines (globulaires ou non) de façon à en comprendre la stabilité et les phénomènes de démixtion, notamment par des études rhéologiques. Certaines études se sont plus précisément intéressées aux changements structuraux des protéines adsorbées à l'interface. D'après les connaissances théoriques du comportement des protéines à l'interface, ces molécules adoptent leur structure à l'environnement par déploiement (Mac Richtie, 1998). Certaines études indiquent que la structure secondaire des protéines à l'interface eau / air ou eau / milieu lipidique change relativement peu. Toutefois ces études n'excluent pas le fait d'un déploiement à un plus haut niveau d'organisation moléculaire (structure tertiaire ou quaternaire) (Shimitzu et Saito, 1996 ; Martin *et al.*, 2003 ; Dickinson, 1992b). Lors de l'adsorption des protéines à l'interface, les unités structurales (hélice- α et feuillet- β) restent intactes. Elles s'orientent généralement de façon parallèle à l'interface et créent des liaisons fortes entre les acides aminés de leurs chaînes latérales (Degrado et Lear, 1985). Par analogie, c'est de cette façon que les protéines globulaires forment des couches condensées adsorbées, dans lesquelles les molécules adaptent lentement leur orientation et leur structure tertiaire afin d'optimiser les interactions de la structure secondaire. La formation de liaisons intermoléculaires se traduit par :

- l'accroissement graduel de l'irréversibilité de l'adsorption (MacRichtie, 1998) et le comportement élastique au cisaillement (Martin *et al.*, 2002a) au cours du vieillissement de l'émulsion (Martin *et al.*, 2003),
- la faible mobilité des protéines dans la couche adsorbée (Clark *et al.*, 1990 ; Coke *et al.*, 1990),
- le déplacement « orogénique » des couches de protéines adsorbées par des surfactifs de faible poids moléculaire.

Le mécanisme du déplacement orogénique fait appel à l'hétérogénéité des films de protéines qui permet l'adsorption des surfactifs au niveau de zones en déficit de protéines. Lorsque ces zones se développent, l'expansion de la fraction de surfactifs implique alors une compression du réseau protéique qui au départ croît en densité, mais pas en épaisseur. Quand une certaine densité critique est atteinte, l'épaisseur du film protéique croît à son tour alors que les zones de surfactifs continuent leur développement en maintenant le volume du réseau protéique constant. En atteignant des pressions de surface suffisantes, le réseau protéique se rompt, relâchant alors les protéines qui désorbent de l'interface) (Mackie *et al.*, 2000a ; Mackie *et al.*, 2000b).

Toutefois, les couches adsorbées de protéines globulaires (par exemple β -lactoglobuline, glycinine de soja et ovalbumine) tendent à se fracturer quand elles sont soumises à de larges déformations (Martin, 2002b).

Une étude, menée par Tirok *et al.*, 2001, montre qu'en présence de protéines fortement hydrolysées, la stabilité des émulsions est plus faible. Ceci semblerait lié à la plus faible baisse d'énergie interfaciale engendrée par la présence de peptides de petite taille. L'application à notre problème de déstabilisation de l'émulsion impliquerait que l'hydrolyse doit être poussée pour produire de tels peptides. Lors de cette même étude, il a été démontré que l'addition d'amidon hydrolysé favorise la coalescence de l'émulsion. Ceci confirme que la méthode choisie qui consiste en l'utilisation de cellulases et peut induire le même type de phénomène dans le système étudié.

Des informations détaillées sur les interactions à faible échelle entre les gouttes d'une émulsion ou entre les gouttes et une interface plane de protéines ont été obtenues par l'étude de films fins. Ces études impliquent la détermination de la pression répulsive entre les surfaces du film, plus connue sous le nom de pression de disjonction. Deux types de films existent : les films noirs newtoniens (FNN) et les films noirs classiques (FNC). Un FNN est un film fin dans lequel les couches adsorbées ont un contact mécanique, alors qu'un FNC est un film fin pour lesquelles les molécules adsorbées sont séparées par une couche mobile d'eau (Dimitrova et Leal-Calderon, 2004).

3.3.2. *Polysaccharides.*

Traditionnellement assimilés à des agents épaississants ou gélifiants, les polysaccharides influencent les propriétés de dispersion des systèmes de par leurs propriétés interfaciales. Par ce biais, ils peuvent intervenir sur les propriétés des émulsions stabilisées par des protéines en jouant notamment sur l'augmentation de viscosité de la phase aqueuse. Il y a alors baisse de la mobilité des molécules en solution d'où une augmentation de la stabilité de celle-ci.

Toutefois ce seul mécanisme ne peut tout expliquer. Parallèlement à ce phénomène, les polysaccharides peuvent s'adsorber à l'interface de la goutte par le biais d'interaction majoritairement électrostatiques, et vont donc modifier la densité de charge de surface de celles-ci, voire générer des complexes avec les protéines déjà présentes. Dans ce cas, on assiste à des phénomènes de floculation par pontage pour une stabilisation stérique (Dickinson, 2003).

Il a été démontré que des molécules de type polysaccharides solubles peuvent s'adsorber de façon compétitive au niveau d'une interface huile / eau et ce en présence de protéines de lait (Nakamura *et al.*, 2004). C'est aussi le cas des pectines du citron qui interagissent avec l'huile extraite de la peau de ce fruit (Scott, D., 1978). Les interactions entre protéines et polysaccharides solubles sembleraient être de nature électrostatique et dépendraient du type de polysaccharide présent. Il a été mis en évidence une déstabilisation du système à pH 7 ainsi qu'une floculation par pontage à pH 4 sur un tel type d'émulsion. Toutefois, ceci dépend de la nature des molécules en présence. La même expérience sur un système légèrement différent n'a pu conduire à une telle déstabilisation du milieu. Ceci prouvant que même si les forces électrostatiques sont présentes, elles ne sont pas les seules et uniques forces d'interaction mises en jeu.

3.3.3. *Lipides : les phospholipides.*

De par leurs propriétés amphiphiles, les phospholipides sont des molécules qui vont stabiliser les émulsions en se positionnant à l'interface des émulsions H/E ou E/H. Appartenant à la classe des surfactifs de faible poids moléculaire, ce sont des agents tensioactifs plus efficaces que les protéines mais ils ne forment pas de film viscoélastique au niveau de l'interface. Leur efficacité en tant qu'agents émulsifiants est attribuée à leur capacité d'auto-assemblage à l'interface entre huile et eau en formant des films fins possédant une organisation semi-cristalline (Shchipunov *et al.*, 1996). Lorsque les phospholipides sont les seuls tensio-actifs présents, et au-delà d'une certaine concentration (CMC : Concentration micellaire critique), ces phospholipides s'auto-associent pour former des micelles qui finissent par s'agréger. Lorsque cette CMC est dépassée la formation de l'émulsion est alors inhibée (Pan *et al.*, 2004). D'autre part, les émulsions ainsi formées (faible concentration en surfactifs stériques), sont connues pour avoir une faible stabilité lors de l'addition d'électrolytes (De Vleeschauwer et Van der Meeren, 1999). En outre, ces molécules perdent facilement leurs propriétés tensioactives par démulcination/dégommage à l'aide d'un acide, phosphorique ou citrique. D'autre part, leur mode de stabilisation est différent et incompatible avec celui des protéines. En présence de protéines et de phospholipides à l'interface, on parle alors de déstabilisation

compétitive, la présence des deux entités impliquant généralement la déstabilisation de l'émulsion. Ces deux molécules se trouvent alors co-adsorbées au niveau de l'interface et le rendent plus fluide, moins élastique, et donc moins stable (Kabalnov *et al.*, 1995 et 1996 ; Wilde *et al.*, 2004).

3.3.4. *Stabilisants à des interfaces liquides.*

L'accroissement de la viscosité d'une solution aqueuse est une des possibilités technologiques mises en œuvre pour limiter les phénomènes de coalescence par empêchement du rapprochement. Une voie potentielle à l'accroissement de viscosité sans modifier la concentration en surfactif est l'emploi de stabilisants. Ces stabilisants sont des molécules de réticulation ne possédant pas de propriété d'activité de surface. Elles peuvent donc être utilisées de façon concomitante aux tensioactifs pour permettre la stabilisation des émulsions à long terme (Dickinson, 2003). C'est à cet effet que des stabilisants polysaccharidiques sont ajoutés à la phase aqueuse afin d'en augmenter la viscosité et ainsi de limiter l'instabilité liée au crémage.

3.4. Mécanismes physiques de déstabilisation des émulsions.

Le terme « stabilité de l'émulsion » réfère à la capacité d'une émulsion à résister aux changements de ses propriétés au cours du temps : plus une émulsion est stable, plus le changement des propriétés est lent.

Une émulsion peut devenir instable du fait de multiples processus physiques ou chimiques. L'instabilité physique induit une altération de la distribution spatiale ou de l'organisation structurale des molécules alors qu'une instabilité chimique va modifier les propriétés structurales de ces molécules. Le crémage, la floculation, la coalescence totale ou partielle, l'inversion de phase ou la maturation d'Oswald sont des exemples d'instabilité physique (Dickinson, 1992) (Figure B 11).

L'oxydation et l'hydrolyse appartiennent quant à eux aux procédés de déstabilisation chimique (Fen Nema, 1996). L'un des objectifs scientifiques est de déterminer l'importance de chacun des mécanismes, de leurs relations, et les facteurs qui les régissent. Grâce à la compréhension de ces mécanismes, une maîtrise de la stabilité des émulsions peut être envisagée. D'autre part, la production de certains aliments implique une déstabilisation contrôlée de l'émulsion lors du procédé de fabrication : c'est le cas pour la production de crème glacée (coalescence partielle lors de la formation des cristaux de glace), de crème fouettée (Ho et Chow, 2002) ou d'huile par voie aqueuse. Dans l'industrie alimentaire, il est

donc primordial de déterminer les facteurs affectant la stabilité de chaque type de produit, ainsi que ceux permettant la détermination de la stabilité des produits issus des différents procédés de fabrication. Dans la réalité, la stabilité des produits alimentaires est souvent très difficile à évaluer du fait de la complexité des produits.

L'étude de ces systèmes passe en général par la mise en œuvre et la compilation des résultats de différentes techniques analytiques au cours du temps. L'étendue de l'effondrement de l'émulsion, ainsi que le mécanisme par lequel celui-ci a lieu, dépend de la composition et de la microstructure ainsi que des conditions environnementales de mise en œuvre de ce procédé (variations de température, agitation mécanique, conditions de stockage).

Le paragraphe qui suit reprend l'ensemble des mécanismes majeurs de déstabilisation, par la suite on fera le point sur les paramètres pouvant les influencer, leurs méthodes de contrôle et les techniques expérimentales permettant leur évaluation.

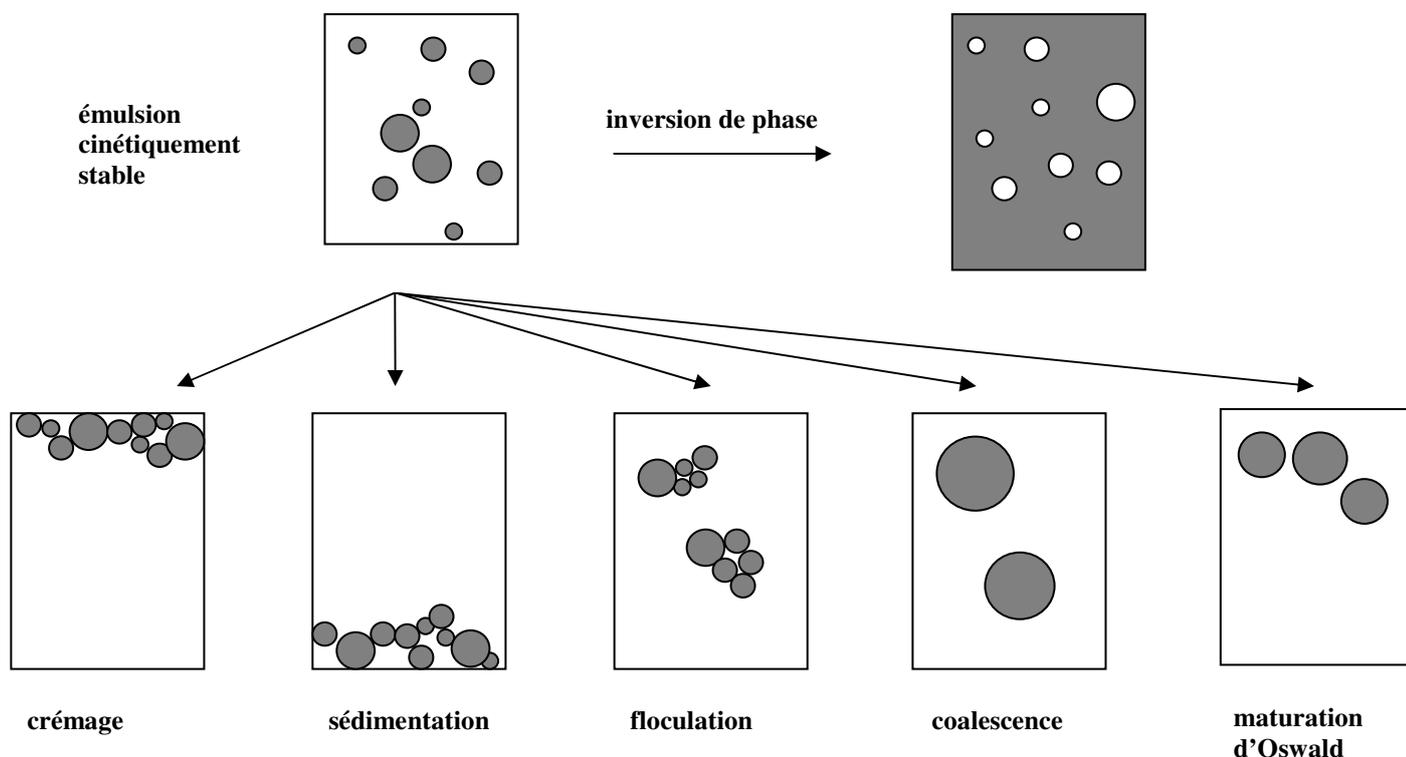


Figure B-11 : Schéma des mécanismes physiques majeurs intervenant dans la déstabilisation des émulsions: crémage, sédimentation, floculation, coalescence, inversion de phase et maturation d'Oswald.

3.4.1. *Crémage et sédimentation.*

Ces deux phénomènes sont le résultat de l'action d'un même champ de forces qui est la pesanteur. Les gouttes dispersées dans de tels systèmes sont animées d'un mouvement brownien induit par les molécules de solvant, la quantité de mouvement étant conservée lors des chocs solvant / particules. Le crémage ou la sédimentation ont alors lieu quand la gravité surpasse l'agitation brownienne (Tadros, 2004). La même goutte est alors soumise au champ de pesanteur terrestre qui tend à imposer un mouvement vers le bas (sédimentation), si la goutte est plus dense que la phase continue, ou vers le haut (crémage), dans le cas contraire. Cette compétition entre agitation brownienne (caractérisée par l'énergie exprimée par le kT , où k est la constante de Boltzmann et T la température absolue) et pesanteur aboutit à une inhomogénéité de l'émulsion laissée sans agitation mécanique.

3.4.2. *Floculation.*

Les gouttelettes en émulsion sont dotées d'un mouvement continu lié à la présence d'énergie thermique, à la gravité et aux forces mécaniques appliquées (Lips *et al.*, 1993 ; Dukhin et Sjoblom, 1996). La floculation a pour origine une adhésion des molécules liée à une compétition entre agitation thermique et forces de Van der Waals (interactions majoritaires) (Derjaguin et Landau, 1941 ; Verwey et Overbeek, 1948). Le mouvement des gouttes conduit à des collisions entre gouttelettes. Si l'interaction attractive entre les gouttes est suffisante, les gouttes ainsi mises en contact restent associées.

Les interactions attractives peuvent avoir plusieurs origines. On distingue alors trois types de floculations : la floculation par interaction de Lifshitz – Van der Waals, la floculation par déplétion et la floculation par pontage.

Dans le premier cas, les interactions engendrées sont des interactions dont la portée est de $1/d^3$ à $1/d^2$ (contrairement aux liaisons de Van der Waals classiques dont la portée est de $1/d^6$) qui permettent l'accolement de deux gouttelettes entre elles.

Le second mécanisme de floculation est induit par la présence de micelles ou de polymères dans la phase continue. Quand les deux gouttes se rapprochent, il arrive un moment où les particules réparties dans tout le volume disponible de la phase continue n'accèdent plus à l'espace entre les deux gouttes. Cette zone de phase continue séparant les deux gouttes est alors trop étroite pour accommoder les pelotes ou les micelles de polymères. On parle alors de déplétion, c'est à dire un appauvrissement du film liquide en objets solvatés. Ceci engendre une différence de pression osmotique induisant un flux de liquide de la zone liquide séparant les gouttes vers le reste de la phase continue. L'accolement des deux gouttes est donc favorisé. C'est le phénomène de floculation par déplétion.

Le dernier processus de floculation, la floculation par pontage, fait appel à l'adsorption simultanée de polymères de haut poids moléculaire à la surface de deux gouttes distinctes. Ceci favorise par pontage la floculation entre ces deux gouttes (Mc Clements, 1999).

Dans le cas d'une telle floculation, il est à noter que chaque gouttelette va conserver son intégrité. De plus certains paramètres peuvent être ajustés afin d'en éviter ou d'en favoriser l'apparition. On peut par exemple jouer sur deux paramètres principaux : la fréquence des collisions, ou leur efficacité, ou les deux simultanément.

3.4.3. *Coalescence.*

La coalescence, contrairement aux phénomènes de floculation, sédimentation ou crémage est un phénomène irréversible. Deux ou plusieurs gouttes vont alors fusionner pour donner une goutte de diamètre supérieur. Le phénomène se répétant, la phase dispersée finit par disparaître par démixtion et l'on revient au système diphasé du départ.

Tous les phénomènes favorisant un rapprochement des deux gouttes place le système dans une situation à priori favorable à la coalescence.

3.4.4. *Maturation d'Oswald.*

La maturation d'Oswald est un phénomène qui dépend de la granulométrie de l'émulsion et de la surpression de Laplace. A l'issue de l'étape de formation de l'émulsion, la population de gouttelettes n'est pas homogène en taille : on observe généralement une distribution granulométrique se rapprochant souvent d'une distribution log-normale. Dans chaque classe de taille il existe donc une surpression de Laplace différente. L'existence de cette surpression implique que le potentiel chimique dans les petites gouttes est plus élevé que dans les grosses gouttes. Le retour vers l'équilibre thermodynamique s'accompagne donc d'un flux de matière des petites gouttes vers les grosses gouttes, au travers de la phase continue. La granulométrie se modifie, les classes de plus faible taille laissent alors place à des gouttes de taille supérieure.

3.4.5. *Inversion de phase*

L'inversion de phase d'une émulsion peut avoir lieu dans des conditions variées. Deux procédés doivent être distingués :

- l'inversion de phase irréversible chaotique induite pour une variation de la fraction volumique de la phase dispersée,
- et l'inversion de phase transitionnelle induite par un changement de température et / ou l'addition d'électrolytes (Tadros, 2004).

Dans le premier cas, l'addition du composant de la phase dispersée (sous agitation) va permettre de faire varier la fraction volumique et donc de modifier la viscosité du système, ce qui aboutit à l'inversion de phase. Dans le second cas, c'est la variation de la nature des tensioactifs à l'interface qui induit l'inversion de phase, la fraction volumique est donc constante.

3.5. Paramètres physiques intervenant dans la stabilité des émulsions : facteurs de contrôle.

De nombreux paramètres interviennent dans la stabilité des émulsions. Le pH, la présence de sels, le ratio phase / volume et la température sont des paramètres qui vont influencer cette stabilité. Toutefois, le paramètre prépondérant qui va déterminer la stabilité à la coalescence est la taille propre des gouttes (Das et Kinsella, 1990).

3.5.1. Fraction volumique de la phase dispersée.

La viscosité d'une émulsion augmente avec la fraction volumique de la phase dispersée. A de faibles concentrations en gouttes, cette augmentation est linéairement dépendante de la fraction volumique. A de plus fortes concentrations, la pente est plus grande. A partir d'une fraction volumique critique de phase dispersée, les gouttelettes sont si proches les unes des autres qu'elles ne peuvent plus se déplacer facilement. Ainsi, les émulsions acquièrent des propriétés semblables à celles de gels dans lesquels les mouvements et chocs entre particules deviennent impossibles. Le système est alors très stable.

3.5.2. Rhéologie des constituants de chaque phase.

La viscosité des émulsions est directement proportionnelle à la viscosité de la phase continue. Ainsi, la présence d'agent épaississant dans la phase aqueuse d'une émulsion huile-dans-l'eau ou la présence de réseaux de cristaux gras dans une émulsion eau-dans-l'huile va définir les propriétés rhéologiques du système. La rhéologie de la phase dispersée n'a qu'une influence mineure sur la rhéologie des émulsions car les gouttes sont couvertes d'une membrane viscoélastique qui leur donne des propriétés similaires à celles de sphères rigides.

On peut influencer la maturation d'Oswald en jouant sur ces propriétés : en minimisant la solubilité dans la phase continue des molécules qui constituent la phase dispersée, on obtient une inhibition du transport de matière : il n'y a donc plus de maturation d'Oswald.

3.5.3. Taille de la goutte.

L'influence de la taille moyenne de la goutte et de la distribution de taille des gouttes sur la rhéologie de l'émulsion dépend de la fraction volumique de la phase dispersée et de la nature des interactions colloïdales. Plus la taille de la goutte est faible, plus l'énergie nécessaire à la déformation sera grande et donc plus le système sera stable. Toutefois, le mouvement brownien étant inversement proportionnel à la taille des gouttes présentes, la fréquence des chocs et la probabilité de rencontre entre particules, sont favorisées par la présence de gouttelettes de petite taille. C'est donc un compromis entre ces deux phénomènes qui confère la stabilité aux émulsions.

Pour un système donné, cette taille va dépendre de différents paramètres :

1. la nature de l'émulsifiant
2. le ratio émulsifiant/phase dispersée,
3. le temps nécessaire à l'émulsifiant pour s'adsorber à la surface de la goutte,
4. l'ampleur avec laquelle l'émulsifiant réduit la tension de surface,
5. l'efficacité de l'émulsifiant à former la couche protectrice et donc de lutter contre la coalescence. (Food Emulsions, 1999)

Tous ces paramètres ont une influence sur la fréquence et l'efficacité des collisions entre gouttes dont dépendent tous les phénomènes de séparation de phase.

✓ **Comment jouer sur la fréquence des collisions ?**

L'étendue des collisions entre gouttes peut être réduite par l'augmentation de la viscosité de la phase continue, induisant un ralentissement du mouvement des gouttes en présence.

On peut aussi jouer sur la concentration des gouttes dans l'émulsion et sur la taille des particules présentes.

La fréquence de collision augmente quand la concentration en gouttes croît ou quand la taille des gouttes décroît (le mouvement brownien est inversement proportionnel à la taille des particules).

✓ **Comment jouer sur l'efficacité des collisions ?**

La floculation peut être évitée en fabriquant une émulsion dans laquelle les forces répulsives des interactions entre les gouttes sont supérieures aux forces attractives. Pour contrôler la floculation d'un système particulier il est donc nécessaire de mettre en évidence le type d'interactions prévalentes dans l'émulsion.

Dans le cas de la plupart des émulsions alimentaires les interactions prévalentes sont de type électrostatique d'où le rôle essentiel du pH.

3.6. Techniques employées pour étudier la stabilité des émulsions.

Les techniques permettant l'étude des caractéristiques et des propriétés des émulsions sont variées. Elles permettent l'obtention de réponses qui sont fonction de la stabilité des émulsions, caractérisant l'organisation des molécules, les interactions entre celles-ci à l'interface ou leur résistance à certaines contraintes. L'observation de l'émulsion se fait alors à différents niveaux, ce qui apporte pour chacune de ces techniques des renseignements spécifiques relatifs à l'émulsion. Ainsi, on va pouvoir mesurer la capacité émulsifiante, la microstructure et la distribution de la taille des gouttes, la fraction volumique de la phase dispersée, la cristallinité de la goutte ou sa charge qui sont des paramètres abordables par différentes techniques résumées dans le tableau qui suit (Tableau B 11).

Tableau B-11 : Techniques utilisées pour la caractérisation d'une émulsion

<i>paramètres recherchés</i>	<i>techniques employées</i>	<i>Références</i>
test de la capacité émulsifiante	indice de stabilité tension interfaciale rhéologie interfaciale	Uruakpa et Arntfield, 2005, Krause et Schwenke, 2001 Kang <i>et al.</i> , 2006 Tadros <i>et al.</i> , 2004
microstructure et distribution de la taille des gouttes	microscopie diffusion dynamique ou statique de la lumière comptage électrique de coups spectrométrie ultrasonique techniques de sédimentation / crémage diffusion de neutrons RMN spectroscopie diélectrique électroacoustique	Roland <i>et al.</i> , 2003 Nakamura <i>et al.</i> , 2004 ; Roland <i>et al.</i> , 2003 ; Abismaïl <i>et al.</i> , 2000 Roland <i>et al.</i> , 2003, Lien et Phillips, 1974 Roland <i>et al.</i> , 2003 Robins <i>et al.</i> , 2002 Lettow <i>et al.</i> , 2005 Denkova <i>et al.</i> , 2004
fraction volumique de la phase dispersée	analyse proximale mesure de densité conductivité électrique	Masmoudi <i>et al.</i> , 2005
crystallinité de la goutte	dilatométrie analyse thermique RMN ultrasons	Clause <i>et al.</i> , 2005
charge de la goutte	potentiel zéta électrophorèse électroacoustique	Roland <i>et al.</i> , 2003 ; Al-shamrani <i>et al.</i> , 2002

Ne pouvant faire un exposé exhaustif de l'ensemble des techniques potentielles, les paragraphes qui suivent se limitent à une reprise sommaire des travaux les plus caractéristiques et des paramètres généralement étudiés.

Ainsi, l'analyse de la taille des particules par diffusion statique de la lumière permet de caractériser la taille des gouttelettes au sein de l'émulsion (Cameron *et al.*, 1991 ; Abismaïl *et al.*, 1999 et 2000, Linarès *et al.*, 2001 ; Einhorn-stoll *et al.*, 2002 ; Sánchez-Vioque *et al.*, 2004). Ce critère est très important, car il est directement relié à la mobilité des gouttes dans le milieu et donc à leur faculté à coalescer. Cependant une limite de la méthode est relative à la turbidité du milieu. En effet, on peut observer qu'à une turbidité trop élevée, des phénomènes de diffusion multiple de la lumière ont lieu. Ceci conduit à une dérive des résultats qui engendre une surestimation de la taille des gouttes rendant impossible la mesure réelle de la taille des gouttes de l'émulsion.

D'autres travaux s'intéressent à la rhéologie de l'émulsion, grâce à des mesures de viscosité, de tension de surface, de résistance à la compression ou d'élasticité qui sont des paramètres directement corrélés à la stabilité (Pons *et al.*, 1995 ; Chen et Dickinson, 1998 ; Chen *et al.*, 1999 ; Hemar et Hoeme, 2000 ; Robins *et al.* 2002 ; Arora *et al.*, 2003 ; Xu *et al.*, 2003). La présence de surfactifs nécessaires pour stabiliser les gouttes contre la coalescence implique la formation d'interactions qui peuvent modifier les propriétés rhéologiques et la capacité de crémage des émulsions (Robins *et al.*, 2002).

Certains travaux, notamment ceux de Roland *et al.* en 2003, ont permis de mettre au point une méthode globale pour évaluer la stabilité des émulsions. En l'occurrence, plusieurs méthodes ont été testées et corrélées entre elles. Cinq émulsions se distinguant par leur procédé d'obtention et leur concentration en surfactifs ont été étudiées. Des analyses portant sur la taille des particules, le profil optique de l'émulsion à l'aide d'un Turbiscan, le potentiel zéta, la viscosité, le pH, la stabilité intrinsèque, la stabilité à la conservation, la stabilité après centrifugation, et enfin des analyses microscopiques ont été effectuées sur chaque émulsion. Quatre des méthodes complémentaires ont été validées : l'analyse de taille, la mesure du potentiel zéta, l'analyse de la turbidité et la stabilité après centrifugation.

Ce travail montre bien la grande complexité des émulsions et la difficulté à adopter une seule et unique technique de caractérisation. C'est pourquoi, en général, une analyse croisée par multiples méthodes s'avère nécessaire.

Toutefois, il est à noter que l'ensemble de ces techniques s'appliquent généralement à des émulsions modèles et qu'il est très difficile de transposer l'ensemble de ces techniques au système étudié du fait de sa complexité et de par sa nature turbide.

3.7. Méthodes de déstabilisation avérées.

La revue de Rosenthal *et al.*, 1996 permet une bonne appréciation de l'ensemble des phénomènes permettant la déstabilisation des émulsions H/E. Elles se rapprochent dans l'ensemble d'autres travaux sur des systèmes plus théoriques tels que des émulsions modèles.

La déstabilisation peut avoir lieu sous différentes formes : par crémage, par sédimentation, par floculation, par coalescence ou par inversion de phase. Un certain nombre de procédés ont donc été mis en évidence, mais leur efficacité est très difficile à contrôler du fait du grand nombre de paramètres propre à chaque méthode, et qu'il est nécessaire de maîtriser.

3.7.1. Déstabilisation par modification du pH et de la force ionique.

La stabilité des émulsions est gouvernée par la nature des interactions entre ces différents constituants : interactions surfactifs/surfactifs, surfactifs/phase continue, surfactif/ phase dispersée dans le cas le plus simple. Le pH et la force ionique vont donc avoir une importance évidente via la présence ou non, d'interactions électrostatiques (attractives ou répulsives) dans le milieu. Le pH détermine alors l'état d'ionisation des molécules à l'interface lorsqu'il s'agit de groupement ionisables (ex : les protéines) et la force ionique implique la présence de sels qui vont pouvoir masquer ou non ces groupements ionisés.

Les émulsions stabilisées par des protéines flocculent à des pH proches du point isoélectrique des protéines stabilisant l'interface. Ainsi, l'addition de base ou d'acide organique, modifiant le pH du milieu va avoir un impact conduisant à la stabilisation ou la déstabilisation du système si les forces majoritaires de ce dernier sont de nature électrostatique. Dans le cas d'une émulsion subissant un traitement enzymatique, la présence de molécules hydrolysées rend très difficile la détermination d'un pHi au sens strict.

Quand la force ionique dépasse un certain niveau pour lequel les répulsions entre les gouttes ne sont plus suffisantes pour empêcher les interactions attractives de Van der Waals ou de déplétion . Les cations multivalents peuvent engendrer l'instabilité des émulsions car ils sont très efficaces par leurs propriétés de masquage de charge (baisse des interactions électrostatiques) et parce qu'ils peuvent se fixer à la surface des gouttes réduisant ainsi le potentiel-zéta (Kim *et al.*, 2002) . L'influence des cations peut être limitée par l'addition dans le milieu d'agents chélatants (EDTA, Citrates, Phosphates). La dépendance au pH peut quant à elle être modifiée par l'introduction de surfactifs ioniques qui par interaction vont modifier le potentiel zéta des gouttes, changeant ainsi la zone de pH où l'émulsion est stable Binks *et al.*, 2000.

3.7.2. Déstabilisation par application d'un stress mécanique.

La coalescence des gouttes a lieu dans une émulsion huile-dans-eau quand le film mince séparant les gouttes est détruit et quand le liquide contenu dans les gouttes fusionne (phase dispersée (Van Aken *et al.*, 2002, 2003b, 2004). Sous certaines conditions les émulsions stabilisées par des protéines génèrent des forces répulsives fortes à courtes distances et sont résistantes à la rupture (Van Aken *et al.*, 2004). Toutefois, sous certaines conditions, l'application d'un stress mécanique tel que le cisaillement, la centrifugation ou l'homogénéisation peut contrecarrer ces propriétés et induire la coalescence (Mc Clements, 2004).

3.7.2.1. Déstabilisation par homogénéisation.

Les protéines globulaires peuvent subir une dénaturation pendant les procédés d'homogénéisation. Cette dénaturation a été attribuée à une modification de surface des protéines plutôt qu'au gradient de pression généré à l'aide de l'homogénéisateur. La dénaturation de ces protéines peut alors avoir un impact sur la stabilité de l'émulsion.

3.7.2.2. Déstabilisation par barattage.

Une des voies étudiée est le barattage, traitement mécanique de l'émulsion à faible température impliquant des phénomènes de coalescence partielle (déstabilisation par agitation mécanique de l'émulsion et rupture du film à l'interface). Cette technique aboutit généralement à une inversion de phase et donc à l'obtention de 2 nouvelles phases : l'une concentrée en huile et l'autre appauvrie (Embong et Jelen, 1977). Cette technique est employée lors de la fabrication du beurre. Elle permet l'obtention à partir de crème de lait, d'une phase concentrée en matière grasse : le beurre et d'une phase appauvrie : le babeurre.

3.7.2.3. Déstabilisation par (ultra)centrifugation.

La centrifugation est une autre phase-clé de l'extraction aqueuse des huiles végétales. Elle permet la récupération des phases extrêmes (résidus solides au débouillage et huile libre en phase légère), et favorise la déstabilisation de l'émulsion. Toutefois, elle est dépendante du matériel et des conditions d'expérimentation (nombre de g, forme du contenant, temps de centrifugation). L'huile est récupérée soit sous forme d'huile brute libre, soit sous forme d'émulsion.

Vold et Groot en 1962 et Embong et Jelen en 1977 ont montré que pour le colza, c'est le temps nécessaire à l'obtention de la vitesse nominale de rotation qui est essentiel. Plus forte est l'accélération pour atteindre une vitesse de rotation donnée, meilleur est le taux de récupération en huile libre. Après la phase de séparation, les protéines peuvent être concentrées dans la phase lourde par précipitation isoélectrique ou par des techniques de fractionnement membranaire.

3.7.3. *Déstabilisation par procédés membranaires.*

Différents matériaux et types de filtration sont à l'étude en vue de la déstabilisation des émulsions par filtration membranaire (Fontes *et al.*, 2005, Hlavacek, 1995, Hafidi *et al.*, 2005). Les résultats publiés jusqu'ici montrent l'obtention d'huile à travers une membrane hydrophobe ou bien d'eau à travers une membrane hydrophile. Ces investigations sont à l'heure actuelle en cours d'étude au laboratoire à l'aide de membranes modifiées à partir de méthylcellulose (hydrophile) sur lesquelles sont greffés des groupements d'époxydodécane (hydrophobes) (Barbar, 2006). Toutefois l'ensemble de ces travaux ne permettent pas encore l'application à des émulsions complexes très stables.

3.7.4. *Déstabilisation par flottation.*

D'autres procédés tels que les phénomènes de flottation obtenus par le biais d'injection d'air dans l'eau, s'avèrent visiblement bénéfiques quant à l'extraction de l'huile dans une phase continue aqueuse. Par des mécanismes de collision et attachement, les globules lipidiques finissent par s'associer après rupture de la membrane interfaciale, libérant ainsi l'huile. Toutefois, la nature des surfactifs utilisés pour stabiliser l'émulsion est extrêmement importante. Al-Shamrani *et al.*, 2002 ont montré qu'une émulsion stabilisée par un surfactif non-ionique (span 20 : monolaurate de sorbitane (E493)) était déstabilisée par flottation en présence de sulfate d'aluminium. A l'opposé, la même émulsion en présence de polyélectrolytes (haut poids moléculaire : hydrocol 882 et 864 et faible poids moléculaire : hydrocol 852 et 1142) censés eux aussi déstabiliser l'interface, reste stable dans les mêmes conditions d'injection d'eau saturée en air à 88% Zouboulis et Avranas, 2000 ; Konovalova *et al.*, 2001 ; Oliveira *et al.*, 1999.

3.7.5. *Déstabilisation par les ultrasons.*

L'ultrasonication est l'application d'ondes sonores à haute intensité et à haute fréquence (Luque-Garcia et Luque de Castro, 2003). Plus qu'une réelle méthode de déstabilisation, puisque le procédé intervient dans la formation des émulsions, cette technique contribuerait en fait à générer une émulsion relativement moins stable.

Lors de leur propagation, les ondes sonores modifient les propriétés physiques et chimiques des matériaux qui y sont soumis et accélèrent le transfert de chaleur et de matière (Mason et Lorimer, 1988) par le biais des phénomènes de cavitation.

Les ultrasons ont déjà été employés lors de l'amélioration d'un certain nombre d'étapes technologiques telles que le séchage, le mélange, l'homogénéisation et l'extraction (Fairbanks, 2001 ; Mason et Lorimer, 1988 ; Mason *et al.* 1996 ; Povey, 1998).

Dans le cas de tissus végétaux, les ultrasons seraient susceptibles de déstructurer les parois cellulaires, facilitant ainsi la libération des composés extractibles. De plus ils favoriseraient le transport du solvant de la phase continue dans les cellules végétales (Vinatoru, 2001). Ceci a été utilisé lors d'études sur des substrats particuliers et ceci préalablement à l'emploi d'enzymes (Shah *et al.*, 2005) ou de solvants (Li *et al.*, 2004). Cette technique s'avère donc bénéfique dans les procédés d'extraction d'huile ou de composés spécifiques des plantes par l'augmentation du rendement et la baisse du temps d'extraction.

Toutefois, dans le cas de l'extraction d'huile, l'emploi des ultrasons doit être limité du fait de l'éventuelle modification du profil des AG qu'elle peut engendrer en cas de traitement prolongé (Skauen, 1967). De plus cette technique est aussi connue pour favoriser l'homogénéisation des milieux sous certaines conditions d'utilisation (haute pression : 300MPa, 200s, 5°C et ultrasons : 34,6 W, 30s, 5°C) (Knorr *et al.*, 2004), ce qui pourrait entraîner dans le cas d'une émulsion végétale l'augmentation de la stabilité de l'émulsion par dispersion des protéines et des lipides. Il est donc nécessaire de bien paramétrer son utilisation. En outre, l'utilisation d'ultrasons implique un coût d'équipement. Il est donc nécessaire de faire une étude pour évaluer l'impact de l'équipement sur le coût total du process. En conclusion, cette méthode est intéressante par l'augmentation du rendement et le gain de temps qu'elle procure. Toutefois, l'ultrasonication est un outil à manier avec précautions.

3.7.6. Déstabilisation par traitement thermique.

La température est un paramètre pouvant être utilisé pour la déstabilisation des émulsions (Gunsetleke et Laurentius, 1974 ; Roxas, 1963, US Patent 3,083,365). Ce paramètre va avoir une influence sur la viscosité des phases en présence et parfois sur la structure des molécules à l'interface. Un traitement thermique va donc modifier les propriétés interfaciales et le mouvement des particules, influençant ainsi la stabilité des émulsions. Quel que soit le traitement thermique utilisé, réchauffement, refroidissement voir congélation, la stabilité de l'émulsion peut en être affectée.

Les paragraphes qui suivent reprennent l'ensemble des mécanismes thermiques responsables de la déstabilisation des émulsions et les paramètres pouvant influencer cette dernière.

✓ **Le traitement thermique par élévation de la température :**

Les émulsions stabilisées par des protéines globulaires (ex : β -lactoglobuline) sont particulièrement sensibles aux traitements thermiques car ces protéines se déploient quand la température dépasse une valeur seuil appelée température critique. Ceci conduit, dans certaines conditions, à l'exposition de certains groupes réactifs (groupements hydrophobes) normalement situés à l'intérieur de la protéine (Kim *et al.*, 2002). Les travaux menés par Kim *et al.*, 2002 montrent que l'émulsion stabilisée par la β -lactoglobuline ne floccule pas à pH 7 du fait des interactions répulsives entre les gouttes qui évitent de les mettre à proximité. En présence de sels, les interactions répulsives sont minimisées et l'on observe alors le phénomène de floculation. La présence de sel et son ordre d'incorporation (avant ou après traitement thermique) a une influence sur l'étendue de la déstabilisation, ce qui est attribué par les auteurs à un déploiement plus intense de la protéine favorisant ainsi les interactions hydrophobes qui surpassent alors d'autant plus les interactions répulsives. Les auteurs notent toutefois, que l'étendue de la floculation est faible quand ces émulsions sont chauffées en l'absence de sels, au dessus de la température critique de dénaturation et que le sel est ajouté après retour à température ambiante. Ces résultats suggéreraient que les interactions entre protéines adsorbées sur différentes gouttes sont favorisées quand les gouttes sont à proximité les unes des autres pendant le chauffage (fortes concentration en sels), mais qu'inversement les interactions entre protéines d'une même goutte sont favorisées quand les gouttes ne sont pas proches les unes des autres pendant le traitement thermique (faible concentration en sels). Dans ce dernier cas, les réarrangements extensifs (interactions protéines-protéines sur la même goutte) qui auraient lieu au dessus de la température critique de dénaturation feraient baisser l'hydrophobicité et le nombre de groupement sulfure en surface. Ces résultats sont présentés dans la Figure B 12.

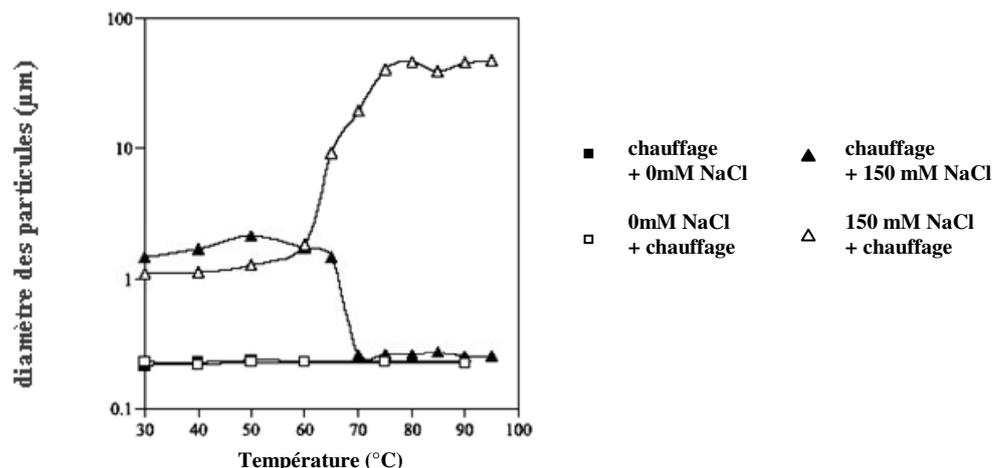


Figure B-12 : Influence du traitement thermique (30-95°C, 20 min), de la concentration en sel (0-150mM NaCl) et de l'ordre d'addition du sel (avant ou après traitement thermique) sur le diamètre moyen $d(4,3)$ d'une émulsion à 5% de n-hexadecane huile-dans-l'eau (0,5 % p β -lactoglobuline, pH 7,0) d'après Kim *et al.*, 2002.

✓ **Le traitement thermique par abaissement de la température :**

Si on refroidit une émulsion huile-dans-l'eau à une température où les lipides sont partiellement cristallisés et où l'eau est complètement liquide, il peut y avoir des phénomènes de coalescence partielle. La coalescence partielle est le procédé par lequel les cristaux gras d'une gouttelette partiellement cristallisée pénètrent dans une région liquide. Ce processus résulte en la formation d'agrégats de forme irrégulière qui fait baisser la stabilité au crémage et augmente la viscosité de l'émulsion. Les facteurs affectant ce mécanisme sont le contenu en huile, l'épaisseur de la membrane interfaciale entourant la goutte, la taille de la goutte et l'agitation mécanique (Walstra, 2003).

Les travaux de Kiokas *et al.* en 2004 ont démontré que ce type de traitement thermique en vue d'une déstabilisation doit être effectué dans des conditions très précises. Sur leur système modèle contenant 30 % d'huile stabilisé par des protéines sériques du lait en forte concentration, le traitement thermique a des influences variables en fonction du moment où il est appliqué. Si les cycles de températures (3 cycles de 5 à 25°C) sont appliqués avant la formation de l'émulsion, l'émulsion formée est instable alors que dans le cas où ces cycles sont mis en oeuvre après la formation de l'émulsion, l'émulsion s'avère stable.

Si on congèle les émulsions, des modifications physicochimiques supplémentaires apparaissent : la cristallisation des lipides, la formation de glace, la variation des concentrations due à la congélation, apparition de transitions interfaciales et de changements conformationnels des biopolymères (Walstra, 2003). Les phénomènes suivants peuvent être

mis en avant, l'importance relative de chacun de ces mécanismes n'étant pas encore très bien précisée :

- Lors de la formation des cristaux de glace les contacts entre gouttes d'huile sont forcés.
- Il n'y a plus forcément d'eau libre pour hydrater suffisamment les molécules d'émulsifiant adsorbées à l'interface, ce qui favorise les interactions goutte-goutte.
- La formation de glace induit une augmentation de la force ionique d'une couche d'eau non cristallisée entourant les gouttes d'huile ce qui peut masquer les répulsions électrostatiques entre les gouttes.
- Il se peut que les cristaux formés pendant la congélation pénètrent, mécaniquement dans les gouttes et détruisent partiellement les membranes interfaciales, ce qui favorisera la coalescence après décongélation.
- Les émulsifiants peuvent s'adsorber à la surface des cristaux de glace ce qui permet de réduire leur concentration au niveau de l'interface.
- Les émulsifiants peuvent aussi perdre leur fonctionnalité quand la température est inférieure à certains seuils dépendant de leur nature et de leurs propriétés.

L'influence du type d'émulsifiant (isolat de protéines sériques, caséines, Tween 20 : monolaurate de sorbitan polyoxyéthylé) a été récemment étudiée sur un certain nombre de systèmes par rapport à leur stabilité face à la cristallisation de la matière grasse et à la formation de cristaux de glace (Vanapalli *et al.*, 2003 ; Palanuwech et Coupland., 2003 ; Thanasukarn *et al.*, 2004). Ces études montrent que les protéines laitières confèrent une plus grande protection contre l'agrégation des gouttes quand la phase grasse est partiellement cristallisée mais que par contre elles ne fournissent qu'un degré limité de protection quand les deux phases sont cristallisées. Ceci a été attribué à la capacité des protéines à former des films relativement fins que les cristaux de matière grasse pénètrent peu. Komatsu et ses collaborateurs ont quand à eux étudié la coalescence des gouttes d'émulsions à base de triacylglycérols stabilisées par des phospholipides (Komatsu *et al.*, 1997 ; Suzuki *et al.* ; 1996). Leurs résultats ont prouvé que l'étendue de la coalescence des gouttes pendant les phases de congélation et décongélation (mesurée par l'accroissement de la taille des particules) est influencée par la nature des phospholipides présents à l'interface, et était inhibée en présence de sels (Saito *et al.*, 1999). La nature du surfactif a donc une grande importance.

On peut par ailleurs noter que la stabilité des émulsions vis à vis de la cristallisation peut être augmentée par ajout de cryoprotecteurs dans le milieu (ex. le saccharose ; Saito *et al.*, 1999 ; Thanasukarn *et al.*, 2004 ; Ghosh *et al.*, 2006) ou par la création de couches multiples de surfactifs autour des gouttes d'huile (Thanasukarn *et al.*, 2004 ; Ghosh *et al.*, 2006). De plus, la répétition de ce type de cycle ne conduit pas forcément à une déstabilisation plus conséquente du milieu (Truong et Phillips, 1976).

Il est aussi à noter qu'une centrifugation préliminaire à l'opération de congélation entraîne le rassemblement des globules lipidiques favorisant ainsi une éventuelle coalescence. (Cramp *et al.*, 2004).

3.7.7. Déstabilisation par application d'un faible champ électrique externe.

Les travaux d'Ichikawa et ses collaborateurs en 2004 ont étudié la déstabilisation rapide d'émulsions denses après application d'un champ électrique faible (1-10 V/cm). La déstabilisation de l'émulsion a lieu sur l'ensemble de l'espace entre les deux électrodes. En présence d'émulsions diluées, les émulsions sont déstabilisées seulement du côté de l'électrode où elles ont été condensées par électrophorèse ce qui indique que le contact mutuel entre les gouttes d'huile est nécessaire pour une déstabilisation rapide de l'émulsion. L'accroissement de la concentration en électrolyte accroît la vitesse de déstabilisation alors que l'ajout de surfactifs ioniques la diminue. De plus, les émulsions stabilisées par des surfactifs non ioniques ne sont pas déstabilisées. Les auteurs concluent que l'ensemble de ces résultats implique un réarrangement à la surface de la goutte d'huile induit par l'application du champ électrique, entraînant une réduction de la barrière énergétique inhérente à la coalescence des gouttes (Ichikawa et Nakajima, 2004). Le mécanisme de déstabilisation, détaillé par ces auteurs est le suivant :

1. Création d'un champ électrique dans la phase aqueuse.
2. Ce champ électrique réarrange les charges de surface des gouttes d'huile de façon à compenser le gradient établi à la surface de chaque goutte, ce qui entraîne la polarisation électrostatique de surface.
3. La polarisation minimise la pression osmotique répulsive dans la double couche de diffusion électrolytique entourant les gouttes ce qui accélère la déstabilisation de l'émulsion.

3.7.8. *Déstabilisation par modification des polyélectrolytes (biopolymères) du milieu.*

Notamment utilisés dans le retraitement des eaux où l'huile est généralement présente sous forme de film ou d'émulsion, les polyélectrolytes peuvent avoir des propriétés d'agents flocculants.

Certains travaux ont abordé l'étude de la déstabilisation ou la stabilisation d'une émulsion par addition de polyélectrolytes. L'existence de deux phénomènes pourtant opposés lors de l'ajout de polyélectrolyte peut s'expliquer suivant qu'ils soient ou non dans des conditions de pH et de concentration favorables, ou en présence d'autres surfactifs. L'ensemble de ces paramètres va impliquer la formation d'interactions entre les polyélectrolytes et les gouttes d'huile d'un côté, ou les polyélectrolytes et les surfactifs stabilisant l'émulsion de l'autre. En fonction de l'étendue relative de ces interactions, l'ajout conduira à la déstabilisation ou la stabilisation de l'émulsion. Ces résultats ont été clairement établis dans les travaux de Tesch et Schubert en 2002 qui ont démontré qu'en fonction de la structure de la molécule de « stabilisant » (impliqué dans la modification de viscosité de la phase aqueuse) des effets de déstabilisation peuvent intervenir du fait de l'inhibition de l'adsorption de protéines, conduisant alors à une séparation de phase.

3.7.9. *Déstabilisation par application de hautes pressions.*

L'application de hautes pressions hydrostatiques en solution aqueuse peut avoir un fort impact disruptif sur les interactions électrostatiques et hydrophobes avec d'importantes implications sur l'état d'agrégation des protéines (Silva et Weber, 1993 ; Galazka *et al.*, 2000a et b). Ces protéines pouvant jouer un rôle dans la stabilisation des émulsions, l'application de hautes pressions peut donc influencer la stabilité de ces dernières.

3.7.10. *Autres méthodes.*

D'autres paramètres amenant à une inversion de phase ont été étudiés. C'est le cas de l'utilisation de la pression pour l'extraction d'huile de noix de coco (Hagenmaier *et al.*, 1972 et 1973) ou d'émulsion stabilisée à l'aide de caséinates et prétraité à l'aide de sels de calcium (Schokker et Dalgleish, 1998). D'autres méthodes font appel à des additions d'huile exogène, ce qui induit une modification de la fraction volumique de la phase dispersée, ce qui, sous certaines conditions d'agitation et de température induit une inversion phase avalanchielle permettant la récupération de l'huile par centrifugation. (Sugarman, 1956).

L'ensemble de ces considérations montre toute la fragilité d'un tel équilibre entre stabilisation et déstabilisation. Chacun des nombreux paramètres est donc à prendre en compte, mais la nature complexe du milieu d'extraction aqueuse des huiles végétales rend difficile la mise en évidence simple d'un processus de déstabilisation efficace. Dans le cas du colza, nous avons affaire à un milieu hétérogène complexe constitué d'un grand nombre de composants qui peuvent quasiment tous avoir un rôle dans la formation et la stabilité de l'émulsion : les lipides, les lipides polaires, les sucres simples ou polysaccharides complexes constituant des parois végétales ou les protéines. De plus l'hydrolyse enzymatique réalisée, de par la modification du milieu qu'elle engendre (formation de peptides et de polysaccharides de tailles variées) complique encore un peu plus le système. Ceci sous entend des phénomènes très complexes à l'origine de la stabilité de l'émulsion et donc une grande difficulté à lever les verrous qui permettent son contrôle.

Matériels et méthodes

1. Méthode de conservation et analyses physicochimiques de la graine.

1.1. Méthode de conservation

Au cours de cette étude, les graines de colza ont été fournies par la société Epilor (Dieulouard, France) en quantité suffisante pour la totalité de la thèse et ont été stockées dans des sacs hermétiques de 2,5 kg de contenance (référence 50038Y, Soplaril, Rueil Malmaison, France) sous vide, à 4°C. Ceci permet de disposer du même échantillonnage de matière première tout au long des essais réalisés, donc de s'affranchir des effets variété, saison, récolte, liés à la variabilité de la matière première "graines de colza".

1.2. Analyses physico-chimiques de la graine.

1.2.1. Détermination du pourcentage d'humidité de la graine

Deux méthodes ont permis la détermination du pourcentage d'humidité de la graine (% Hté) : une méthode physique (étuvage) et une méthode chimique (Karl Fischer).

1.2.1.1. Détermination du pourcentage d'humidité de la graine par la méthode physique ou méthode par étuvage.

(Norme AOAC 950.01, 1990)

Environ deux grammes de graines sont séchés par étuvage à 103°C pendant 3 heures (jusqu'à masse constante), puis refroidis pendant une heure au dessiccateur. La perte de masse observée à la suite de cet étuvage est alors assimilée à la masse d'eau contenue dans le produit. Les résultats sont exprimés, pour trois essais réalisés indépendamment, en g d'eau/100g de graines.

1.2.1.2. Détermination du pourcentage d'humidité de la graine par la méthode chimique ou méthode de Karl-Fischer.

(Norme AOAC 966.20, 1997)

✓ Principe :

Le dosage du pourcentage d'humidité de la graine a lieu par la méthode titrimétrique de Karl-Fischer. La méthode est basée sur la réaction chimique suivante :



Caractérisation des constituants de la graine de colza

En présence de deux réactifs, la liqueur de Karl-Fischer (Hydranal ©) et le méthanol 99,9%, solvants de l'iode et de l'anhydride sulfureux, le titrage est suivi à l'aide d'une électrode de platine à deux pointes dont les deux pôles sont raccordés à une source de courant. La tension qui est mesurée par la paire d'électrodes polarisées sert de signal à l'entrée du régulateur. Quand les dernières traces d'eau sont titrées, la tension tombe pratiquement à zéro : les deux électrodes sont dépolarisées par l'iode en solution. Le faible courant électrique oxyde l'iode sur une électrode et réduit la même quantité d'iodure sur l'autre.

✓ **Mode opératoire :**

L'appareil utilisé est un titrateur automatique de type Mettler DL 18 Karl-Fischer titrator. 0,1g d'échantillon est pesé à 0,001g près puis introduits dans la cellule de mesure. Le titrateur injecte de façon automatique l'hydranal et le méthanol permettant le dosage de l'eau jusqu'à obtention d'un potentiel nul. Le résultat du dosage est alors exprimé en g/100g de poudre (Précision : 0,001%).

Les résultats exprimés représentent la moyenne de 3 répétitions et l'écart-type associé.

1.2.2. Estimation du taux de cendres.

Environ 500 mg d'échantillon ont été introduits dans un four à pyrolyse jusqu'à calcination complète (600°C, 12 h). Les cendres obtenues sont pesées et l'on exprime alors le résultat en % du poids de cendres par rapport au poids initial de l'échantillon (Norme AOAC 923.03).

1.2.3. Détermination de la teneur en minéraux de la graine : spectroscopie atomique par ionisation de flamme.

✓ **Principe et mode opératoire**

La spectroscopie d'absorption atomique est basée sur le principe qu'une population d'atomes à l'état E_0 peut absorber des photons d'énergie $h\nu$ et qu'une estimation du nombre de photons absorbés peut être reliée à la concentration de l'élément dans la solution à analyser.

Les concentrations de Ca, Na, K et Mg ont été déterminées par absorption atomique (spectrophotomètre d'adsorption atomique 1100, Perkin Elmer Instruments, Bois d'Arcy, France), alimentée par une flamme air-acétylène (C_2H_2). Les gammes étalons sont constituées de solutions contenant les différents cations à des concentrations croissantes situées dans le domaine de linéarité concentration/absorbance. Les échantillons de graine sont dilués après minéralisation au 1/100, avec ou sans chlorure de lanthane suivant le minéral à doser.

1.2.4. Evaluation de la teneur en phosphore (P) de la graine.

La teneur en phosphore a été déterminée après minéralisation d'environ 1 gramme de graines pendant une nuit à 520°C dans des creusets en porcelaine. Le phosphore est alors transformé

Caractérisation des constituants de la graine de colza

en orthophosphate inorganique. Les cendres sont alors solubilisées dans 5mL d'acide sulfurique concentré. Cette solution est ensuite introduite dans une fiole jaugée de 250 mL complétée à l'eau distillée. On fait alors réagir en milieu réducteur du molybdate d'ammonium qui va former du phosphomolybdate d'ammonium de couleur bleue. L'absorbance est alors mesurée à 660 nm contre une gamme étalon allant de 0 à 6mg/L en 8 points. Les résultats reflètent la moyenne de trois essais et leur écart-type associé.

1.2.5. Evaluation de la teneur en protéines de la graine : méthode de Kjeldahl.

(AOAC 1997 960.52)

La mesure de la teneur en protéines de la graine est effectuée selon la méthode de Kjeldahl.

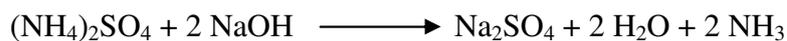
✓ **Principe et mode opératoire :**

On introduit dans des matras (tubes de minéralisation) un échantillon de graine ou de fractions lyophilisées (environ 0,100 g à 0,001 g). Les échantillons sont alors minéralisés sur une rampe de minéralisation de type Kjeldatherm (Gerhardt, Les Essarts le Roi, France) à 420°C pendant 2H00.

Le produit de la minéralisation des substances azotées contient essentiellement du sulfate d'ammonium (matières azotées + H₂SO₄ → (NH₄)₂SO₄).

On ajoute alors dans les matras de la soude 10 N en volume égal au volume d' H₂SO₄ utilisé pour la minéralisation soit 2 mL de façon automatique à l'aide d'un appareil de type microanalyse Vapodest 50 (Gerhardt, Les Essarts le Roi, France).

La réaction suivante a lieu :



L'ammoniac dégagé se combine directement à la vapeur d'eau pour former de l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH). Celui-ci, entraîné par la vapeur se condense dans le réfrigérant et est finalement récupéré dans une solution d'acide borique dont le pH est mesuré de façon continue. Il se forme alors du borate d'ammonium (NH₄)₃BO₃ ce qui fait augmenter le pH de la solution. La solution est alors titrée de façon automatique par un acide fort (H₂SO₄ 0.01N) qui va déplacer ce sel jusqu'au retour à la valeur de pH initiale. Le volume d'H₂SO₄ 0,01N correspond à l'ammonium contenu dans le matras au départ, c'est à dire à l'azote de la fraction minéralisée.

L'azote total pour 100 g de graines (Nt) correspond alors à :

$$Nt = (V_1 - V_0) \times M N_2 \times N(H_2SO_4) \times 100 / (1000 \times m_e)$$

Caractérisation des constituants de la graine de colza

Avec N_t = azote total pour 100 g de graines ou d'échantillon.

V_1 : volume de H_2SO_4 en mL nécessaire à la titration de l'échantillon.

V_0 : volume de H_2SO_4 en mL nécessaire à la titration du blanc.

M_{N_2} : masse moléculaire de l'azote soit 14g / mole.

$N(H_2SO_4)$: Normalité de l'acide sulfurique.

m_g : masse de l'échantillon de départ en g.

Il est alors converti en g de protéines/100g de graines en multipliant le résultat obtenu par le facteur protéique pour le colza qui est de 6,25 (Adler Nissen, 1986 ; Rozan, 1997). Chaque expérience est répétée trois fois. On calcule alors la moyenne et l'écart-type.

1.2.6. Détermination de la teneur en lipides totaux.

1.2.6.1. Extraction des lipides totaux par la méthode de Bligh & Dyer (1959).

La teneur en lipides totaux des fractions est calculée après extraction selon la méthode de Bligh & Dyer (1959).

Une quantité connue de matière (m_0 en g = 40 g), issue d'une fraction dont la quantité globale est connue (m_{0tot} en g), est introduite dans un bécher. Après ajout de volumes variés de solvants sur le milieu et broyages successifs de 20 secondes, le milieu est filtré sur un verre fritté n°3 (ratio final des solvants : chloroforme/méthanol/eau : 2/2/1,8).

Le filtrat est alors incorporé dans une ampoule à décanter. Après séparation des différentes phases, la fraction inférieure est récupérée dans un ballon taré (m_{b1} en g). Après évaporation du solvant à l'aide d'un rotavapor (modèle Laborota 4000, Heidolph, Nuremberg, Allemagne), le ballon est de nouveau pesé (m_{b2} en g). La masse de lipides totaux dans la fraction m_{Lt} est alors égale à :

$$m_{Lt} = (m_{b2} - m_{b1}) \cdot m_{0tot} / m_0$$

avec m_0 : masse de la fraction analysée en grammes

m_{0tot} : masse totale de la fraction analysée en grammes

m_{b1} : masse initiale du ballon en grammes

m_{b2} : masse du ballon en g après évaporation du solvant en grammes

m_{Lff} : masse totale des lipides dans la fraction en g

D'où un pourcentage de lipides totaux de la fraction ($\%L_T$) :

$$\% L_T = m_{Lff} \cdot 100 / m_{Lt}$$

Caractérisation des constituants de la graine de colza

avec m_{Lfr} : masse de lipides totaux de la fraction analysée en g

m_{Li} : masse de lipides totaux du milieu en g

Chaque expérimentation est répétée trois fois et l'on exprime alors les résultats sous forme de moyenne.

1.2.6.2. Extraction de l'huile par la méthode de Soxhlet.

L'extraction de l'huile des graines a aussi été réalisée par la méthode de Soxhlet. Trois solvants d'extraction ont été utilisés respectivement l'hexane (point d'ébullition : 69°C sous pression atmosphérique), l'éther de pétrole ou essence G (point de d'ébullition 30-75°C, 1 bar) et enfin un mélange éther de pétrole/éther diéthylique 1:1 (v/v) (point d'ébullition de l'éther diéthylique : 34,6°C sous pression atmosphérique). Les extractions se sont déroulées sur 7 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'huile par rapport à la matière initiale après pesée d'un ballon, préalablement taré, ayant subi une évaporation du solvant.

1.2.6.3. Extraction des lipides totaux au Butanol.

L'extraction des lipides totaux au butanol a été réalisée en suivant la méthode décrite par Osagie et Kato en 1984. Dix grammes de graines sont introduits dans un bécher. Après ajout de butanol saturé en eau chaude avec un ratio poids de l'échantillon volume de solvant 1:5 p/v, le milieu est agité de façon vigoureuse pendant une heure à 60°C. Le milieu est alors filtré sur vers fritté (N°3) à l'aide d'une pompe à vide branchée sur l'eau, associée à une fiole à vide. Les graines sont récupérées et l'ensemble des opérations est encore répété deux fois. Les fractions collectées après filtration sont rassemblées, refroidies à 20°C, centrifugées de façon à enlever la partie insoluble résiduelle puis évaporées à l'aide d'un rotavapor de type Laborota 4000 (Heidolph, Nuremberg, Allemagne) après transfert dans un ballon taré de façon à obtenir les lipides totaux. L'expérience est répétée trois fois et les résultats sont exprimés de façon à obtenir la moyenne de la teneur en lipides totaux pour 100 g de graines.

1.2.6.4. Extraction des lipides totaux par la méthode éthéro-ammoniacale.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

La teneur en lipides totaux de l'émulsion a été déterminée par la méthode de Röse-Gottlieb à l'aide de butyromètre de Pien. A 10 ml d'émulsion est ajouté 1ml d'ammoniac concentré (23° Be). Après agitation, 10 ml d'alcool éthylique à 95°, 25 ml d'éther diéthylique puis 25ml d'éther de pétrole sont ajoutés successivement, avec à chaque étape une agitation douce du butyromètre et un dégazage. Après 2h de décantation, la phase supérieure éthérée est transférée dans un bécher préalablement taré. L'addition d'éther diéthylique et d'éther de pétrole est alors renouvelée dans les mêmes conditions. Après 2 nouvelles heures de décantation, la phase éthérée est récupérée dans le même bécher puis évaporée sous hotte aspirante. Le bécher est finalement séché à 103°C pendant 30 min. avant d'être pesé. La matière grasse est alors exprimée en g pour 100g d'émulsion.

2. Analyses physicochimiques de l'huile et des lipides totaux.

2.1. Indice d'iode.

(AOAC, norme 920.159, 1997)

L'indice d'iode est le nombre de g d'iode fixé sur les doubles liaisons de 100g de corps gras. Il renseigne sur la quantité d'acides gras insaturés présents dans un corps gras. Le dosage consiste à faire réagir une solution halogénante, le réactif de Wijs sur l'échantillon préalablement dissous dans le tétrachlorure de carbone. On ajoute ensuite une solution d'iodure de potassium (KI) afin d'extraire l'iode en excès dans la phase aqueuse et l'on titre en retour par le thiosulfate de Sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,1N).

La réaction est accélérée par l'emploi d'un catalyseur, l'acétate mercurique dans l'acide acétique.

L'indice d'iode (II) se détermine ainsi :

$$\text{II} = ((V_0 - V) \times N \times 12,69) / \text{g de matière grasse}$$

où V_0 est le volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour titrer le blanc

V est le volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour titrer l'essai

N est la normalité de la solution de thiosulfate de sodium.

2.2. Indice de saponification

(AOAC, norme 920.160, 1997)

L'indice de saponification correspond au nombre de mg de KOH nécessaire pour estérifier 1g de matière grasse. Il indique la quantité d'acides gras totaux présents dans un corps gras.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

2g d'échantillons sont dissous dans une solution de KOH (0,5M) dans l'éthanol sont introduits dans un erlenmeyer. L'erlenmeyer est connecté à un condenseur à air et porté à ébullition pendant 30 minutes.

L'excès de KOH est titré par une solution d'acide chlorhydrique HCL (0,5N), en présence de phénolphtaléine.

L'indice de saponification (IS) se détermine ainsi :

$$\text{IS} = 28,05 \times (V_0 - V) / \text{g de matière grasse}$$

où V_0 est le volume d'acide chlorhydrique (ml) nécessaire pour titrer le blanc

V est le volume d'acide chlorhydrique (ml) nécessaire pour titrer l'essai.

2.3. Indice d'acide (altération de la qualité de l'huile).

(AOAC, norme 969.17, 1997)

L'indice d'acide est le nombre de mg de KOH nécessaire pour neutraliser l'acidité libre d'1g de matière grasse.

La prise d'essai (0,5g environ) est dissoute dans un mélange éthanol /éther diéthylique (1 :1 vol/vol). Le titrage est réalisé avec une solution d'hydroxyde de potassium KOH (0,1N), en utilisant la phénolphtaléine comme indicateur coloré. L'indice d'acide se détermine alors ainsi :

$$\text{IA} = V \times N \times 56,11 / \text{g de matière grasse}$$

où V est le volume de KOH (ml) nécessaire à la neutralisation des acides gras libres.

N est la normalité de la solution de KOH.

L'acidité correspond alors au pourcentage d'acides gras libres, exprimé en pourcentage d'acide oléique :

$$\text{Acidité (\% acide oléique)} = ((\text{IA} \times 282) / 56,11) \times 100$$

2.4. Indice de peroxyde (altération de la qualité de l'huile).

(AOAC, norme 965.33, 1997)

L'indice de peroxyde correspond à la quantité d'oxygène actif du peroxyde contenu dans une certaine masse de produit capable d'être libéré dans les conditions de l'expérience. Environ 5g de produit sont dissous dans du chloroforme et de l'acide acétique. L'iode libéré est titré avec une solution de thiosulfate de sodium (0,02N), en utilisant l'empois d'amidon comme indicateur coloré.

L'indice de peroxyde (IP) se détermine ainsi :

$$\text{IP} = (\text{V}-\text{V}_0) \times \text{N} / \text{g de matière grasse}$$

où V_0 est le volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour titrer le blanc

V est le volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour titrer l'essai

N est la normalité de la solution de thiosulfate de sodium

2.5. Analyse des lipides totaux par calorimétrie différentielle à balayage.

✓ Principe :

La méthode d'analyse calorimétrique différentielle permet d'étudier les transformations physiques propres des échantillons ainsi que les réactions de l'échantillon avec le milieu extérieur, le transfert de masse étant associé à une libération ou une absorption d'énergie. Lors d'une réaction chimique, ou durant un changement d'état physique d'un corps (fusion, cristallisation ou changement de forme cristalline), de la chaleur est soit libérée, soit absorbée. Un dispositif à thermocouples mesure la différence de température entre les deux échantillons. En l'absence de réaction ou de transformation, l'écart de température est faible et régulier : c'est la ligne de base. La chaleur de la transformation correspond à la variation d'énergie qui est mesurée par calorimétrie différentielle ou analyse enthalpique différentielle, qui permet de mesurer de façon qualitative et quantitative les caractéristiques d'échauffement d'un corps sans changement d'état. Parce que l'analyse soustrait au flux d'énergie dégagé par l'échantillon celui d'un point de référence constitué par une capsule vide, l'analyse est alors dite différentielle (Figure C 1).

En soumettant l'échantillon à une variation contrôlée de température on peut alors enregistrer :

Les températures correspondant à ces changements d'état,

La quantité de chaleur nécessaire pour faire varier la température de l'échantillon sans changement d'état,

La quantité de chaleur nécessaire pour faire varier son état :

- ✓ une réaction endothermique correspond à une fusion ou une dénaturation thermique.
- ✓ une réaction exothermique correspond à une cristallisation ou une décomposition.

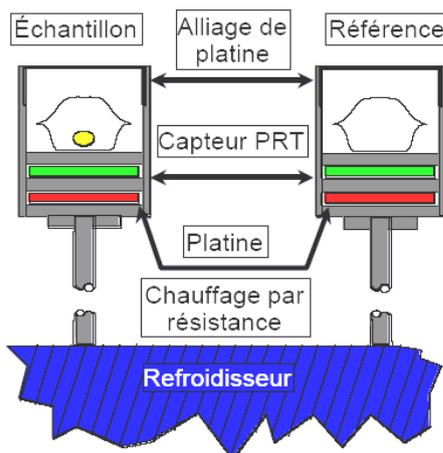


Figure C-1 : Schéma du dispositif permettant les mesures DSC

✓ Mode opératoire :

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un calorimètre différentiel de type Perkin-Elmer, modèle Pyris 1 (Perkin-Elmer Corp., Norwalk CT), commandé par le logiciel Pyris1.

L'analyse calorimétrique différentielle a permis d'établir le profil thermique des lipides totaux extraits à partir des différentes fractions.

La masse de matière grasse initiale est de l'ordre de 7 mg. Après stabilisation de la température à 50°C pendant 5 min le balayage se fait à la vitesse de 5°C par minute de +50°C à -50°C. La température est alors stabilisée à -50°C pendant 5 min puis un nouveau balayage est réalisé de -50°C à 50°C. Les résultats sont exprimés par la température et ΔH_p : enthalpie de la transformation (fusion et cristallisation des lipides analysés).

2.6. Détermination de la teneur en corps gras solides par Résonance magnétique nucléaire RMN.

(AOCS cd 16-81)

La teneur en matière grasse solide a été déterminée par la méthode officielle de l'AOCS cd 16-81. Les mesures de résonance magnétique nucléaire ont été réalisées à l'aide d'un appareil de type Minispec (Bruker Optics, The Woodlands, USA).

La matière grasse à analyser est fondue à 80°C et maintenue à cette température pendant 15 minutes. Un échantillon est alors prélevé après homogénéisation puis introduit dans un tube de 10 mm de diamètre et 4cm de hauteur. La température de l'échantillon est alors maintenue à 60°C pendant au moins 5 minutes. Cet échantillon est ensuite transféré à 0°C et maintenu à cette température pendant 60 minutes exactement. Puis, il est porté à la température souhaitée (température de mesure) pendant 30 minutes soit 5°C et 20°C.

2.7. Observation macroscopique des lipides totaux : mesure de couleur.

✓ **Principe :**

L'évolution de la couleur des lipides totaux a été mesurée en utilisant un appareil microflash® 200d (Datacolor International). Ce colorimètre permet de déterminer les paramètres de l'espace chromatique CIE $L^*a^*b^*$, définie par la commission internationale de l'éclairage. Ce système de paramètres L, a et b, a pour avantage de représenter des différences égales de couleurs perçues par des distances égales sur le diagramme de chromaticité. Le paramètre L correspond à la clarté (Luminance), tandis que a et b correspondent aux indices chromatiques vert-rouge et bleu-jaune. Comme l'indique la Figure C 2, plus les indices sont négatifs plus les échantillons sont verts et bleu, plus ils sont positifs plus les échantillons sont rouges et jaunes respectivement.

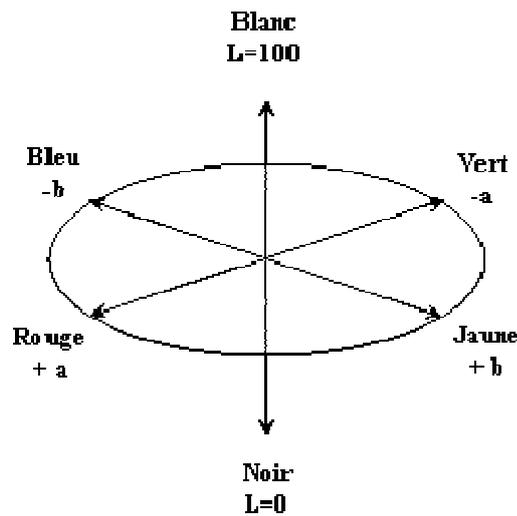


Figure C-2 : Schéma représentatif de l'espace chromatique CIE $L^*a^*b^*$

✓ **Mode opératoire:**

4 g de lipides sont incorporés dans un bécher de 4 cm de diamètre. La mesure de couleur est effectuée après calibration de l'appareil avec les étalons noir puis blanc. Celle-ci s'effectue par l'apposition directe de la cellule de mesure sous le bécher. Les résultats représentent la moyenne de cinq mesures et leur écart-type associé.

2.8. Détermination des différentes classes de lipides par Iatroscan®.

L'utilisation du Iatroscan® étant peu répandue, cette méthode sera détaillée en raison de son originalité.

✓ Principe :

Cette méthode développée par la société IATRON Inc. (Tokyo, Japon) est basée sur le principe d'une détection par ionisation de flamme (DIF) effectuée à la suite d'une chromatographie sur couche mince. Il permet de séparer, d'identifier et de quantifier des échantillons de quelques nanogrammes, la limite de résolution de l'appareil étant fixée à 0,5 nanogrammes. Le support chromatographique ou *chromarod* est une baguette de quartz de 1 mm de diamètre recouvert d'une pellicule de 75µm d'épaisseur de phase SiO₂ à fine granulométrie: 3-5µm, associée à un liant inorganique. Les *chromarods*, au nombre de 10, sont montés sur des cadres métalliques ce qui permet une bonne répétabilité des résultats par la multiplication des dépôts souhaités et ceci lors d'une même expérimentation.

Cet instrument (Figure C 3) permet d'apporter une solution chromatographique sans phase préparatoire à presque tous les types d'échantillons liés aux substances complexes peu ou pas volatiles ou bien qui présentent un point d'ébullition élevé.

Après dépôt des échantillons sur les *chromarods*, puis séparation dans des bains de solvants organiques variés, la détection s'effectue par brûlage au sein d'une flamme dans laquelle les éluats sont vaporisés puis ionisés. Le brûlage des *chromarods* et le traitement des données par le logiciel Chromstar™ permet alors l'obtention de pics gaussiens représentatifs de la composition de l'huile. La réponse est linéaire sur une très large gamme de concentration.

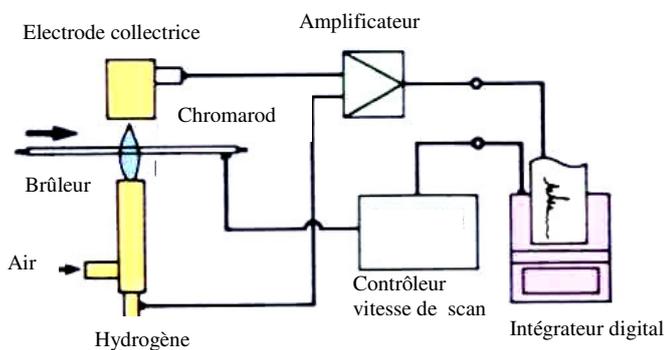


Figure C-3 : Schéma représentatif du principe de fonctionnement du Iatroscan®.

Cet appareil permet différents types de brûlage en vue de l'analyse chromatographique.

Le brûlage complet des *chromarods* :

Caractérisation des constituants de la graine de colza

Ce type de brûlage permet, après élution, la révélation des classes lipidiques en présence. Le résultat est conditionné par le type de solvants utilisé lors de la migration sur *chromarods* et donne lieu, par exemple, à la séparation entre lipides polaires et apolaires. L'ensemble des composés déposés sur le *chromarod* sont détruits et donc non collectables (Figure C 4).

Le brûlage partiel des *chromarods* :

Cette technique chromatographique permet de travailler sur un seul échantillon avec des phases successives d'élutions adaptées aux composés à analyser. Chaque composé lipidique ayant une polarité propre, son affinité pour le solvant permet une élution et une analyse spécifique en fonction des solvants utilisés. Quand des composés ne sont pas séparés de façon optimale dans un premier système d'éluant, du fait d'une migration quasi-identique, leur migration ultérieure dans un second système peut permettre une meilleure séparation (Figure C 5).

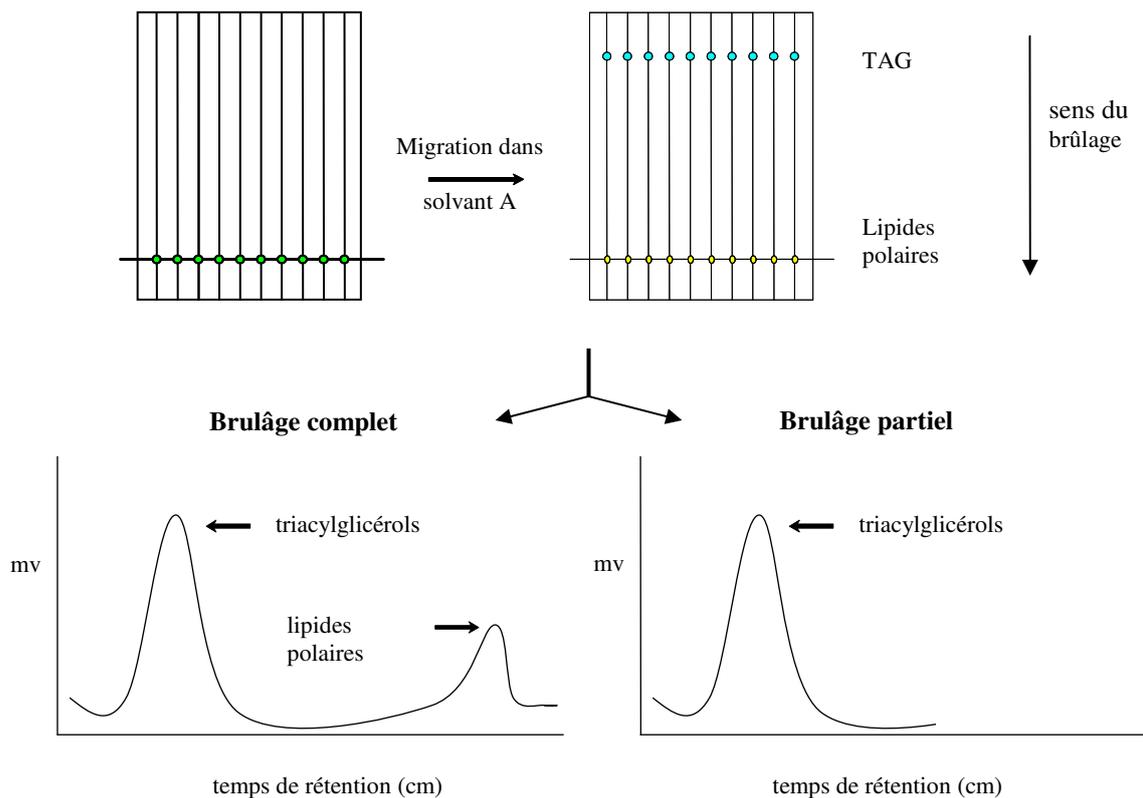


Figure C-4 : Comparaison des chromatogrammes obtenus après brûlage complet ou partiel des chromarods® avec TAG : triacylglicérols.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

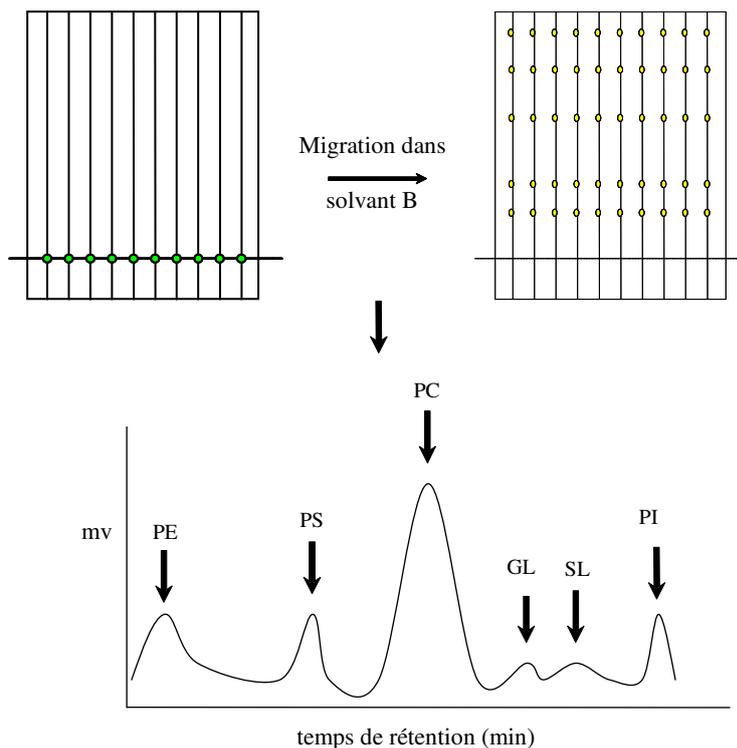


Figure C-5 : Représentation schématique des chromatogrammes obtenus lors de la séparation de lipides polaires avec PE : phosphatidyléthanolamine, PS : phosphatidylsérine, PC : phosphatidylcholine, GL : glycolipides, SL : Sphingolipides et PI : phosphatidylinositol.

✓ **Mode opératoire :**

Des analyses de type brûlages complet ou partiel ont été réalisées sur les échantillons.

2 μ l de lipides à 5 mg/mL ou 10 mg/mL sont déposés sur les *chromarods* (Figure C 6A). Après séchage à 103°C pendant une minute et saturation en humidité (10 minutes dans une enceinte saturée en NaCl), la migration des lipides en fonction de leur affinité pour le mélange éluant a lieu dans des cuves adaptées à ce type de réaction (Figure C 6B). Le premier mélange de solvants utilisé (solvant A, temps de migration 27min), dans notre cas hexane/éther diéthylique/acide formique : 70:30:0,2 permet la séparation des composés apolaires (triacylglycérols : TAG) et des composés polaires (phospholipides et glycolipides). Alors que les composés apolaires migrent sur les *chromarods*, les composés polaires restent au niveau de la ligne de dépôt car ils n'ont pas d'affinité pour ce solvant. Les *chromarods* avec un dépôt de 5 mg/mL subissent un brûlage complet, ce qui permet de définir le ratio lipides polaires/lipides apolaires. Les autres (dépôt de 10 mg/mL) subissent un brûlage partiel : les TAG sont révélés alors que les lipides polaires font l'objet d'une seconde élution.

Le second mélange de solvant utilisé (solvant B, temps de migration 42 min), chloroforme/méthanol/H₂O/ammoniac (65:35:5:0,28), permet la séparation des composés polaires (phospholipides et glycolipides). Les composés polaires migrent alors en fonction de leur

Caractérisation des constituants de la graine de colza

affinité pour le solvant. On a alors séparation des différents composés polaires présents par discrimination de leur temps de rétention.

L'utilisation d'étalons a permis l'identification des différentes classes lipidiques. Chaque analyse de standard et d'échantillon a été répétée trois fois. Le Tableau C 1 qui suit présente l'ensemble des standards utilisés.

Tableau C-1: Présentation des standards utilisés lors de l'étude des classes lipidiques par Iatroscan®.

<i>standards utilisés</i>	<i>abréviations</i>	<i>lots</i>	<i>références</i>	<i>origines</i>
<i>phosphatidylcholine</i>	PC	WA13429, 1120736 53404211	61751, Biochemika	jaune d'oeuf frais
<i>phosphatidylsérine</i>	PS	WA13577, S20572-204	79406, Biochemika	cerveau bovin
<i>lysophosphatidylcholine</i>	LPC	442160/1 63304031	62962, Biochemika	jaune d'oeuf
<i>cholestérol</i>	Chol	050K5304	C8667, Sigma	nd
<i>acide phosphatidique</i>	PA	083K5222	P-9511, Sigma	lécithines de jaune d'oeuf
<i>phosphatidyléthanolamine</i>	PE	070K5200	P-8068, Sigma	<i>Escherichia Coli</i>
<i>phosphatidylinositol</i>	PI	072K5216	P-8443, Sigma	foie bovin
<i>1-stéaroyl-sn-glycérol</i>	MAG	102H8446	M-2015, Sigma	nd
<i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycérol</i>	DAG	017H8437	D-9135, Sigma	nd
<i>1,3-distéaroyl-2-oléoyl-glycérol</i>	TAG	101H8440	D-3907, Sigma	nd



A



B

Figure C-6 : Photographies du matériel utilisé lors de l'emploi du Iatroscan®.

A. dépôt des échantillons

B. Four, lampes UV et Cuves de migration

2.9. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

✓ **Principe :**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation des substances chimiques qui repose sur des différences de comportement de séparation entre une phase mobile courante et une phase stationnaire pour séparer les composants d'un mélange. Si les conditions d'équilibre thermodynamique sont remplies de façon idéale, les molécules du soluté se dispersent de façon gaussienne et leur distribution à la sortie de la colonne peut être figurée par une courbe de Gauss, qui est un pic spécifique à chaque élément à analyser du fait de temps de rétention spécifique dans la colonne en fonction de leur affinité pour celle-ci. Cette méthode permet donc l'analyse de la composition des lipides en acides gras après estérification et permet la détermination exacte de la composition des lipides par comparaison avec des standards.

✓ **Mode opératoire :**

Les esters méthyliques d'acides gras ont été obtenus par transméthylation d'aliqouts des lipides totaux (50mg) avec 1 mL de trifluorure de Bore (8% w/v) pendant 60 min à 100°C dans un bain à sec monoporteur (Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France) comme décrit par Ackman, 1998. L'ensemble des échantillons est conditionné sous azote à chaque étape.

L'appareillage utilisé pour l'analyse des esters méthyliques d'acides gras est un chromatographe phase gaz de type Perichrom 2000 (Saulx le Chartreux, France) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et une colonne capillaire (25 m (longueur) x 0,25 mm (diamètre interne) x 0,5 mm (diamètre externe), BPX70 SGE, Australia Pty Ltd). Pour réaliser une bonne séparation des esters d'acides gras le programme utilisé était le suivant : la colonne étant à la température initiale de 120°C pendant une minute, la montée en température a lieu à raison de 3°C/min jusqu'à une température de 220°C pour y rester 20 min. Le retour à la température initiale se fait à raison de 39,9°C/min. Le logiciel Winilab (Périchrom, Saulx-le-Chartreux, France) est utilisé pour l'intégration des chromatogrammes obtenus. Les acides gras sont alors identifiés par comparaison avec le temps de rétention de standards appropriés (AGPI 1, ref. 47033, source marine 1 et AGPI 2, ref. 47015U, source animale, Sigma). Chaque expérimentation est répétée trois fois et les résultats sont exprimés sous forme de moyenne.

2.10. Détermination spécifique des composés polaires et apolaires des lipides totaux : chromatographie sur couche mince couplée à la chromatographie en phase gazeuse.

La chromatographie sur couche mince classique a été mise en oeuvre afin de détecter les différentes classes de lipides (polaires et apolaires) présents dans les lipides totaux de la graine de colza en fonction des différentes méthodes d'extraction. La chromatographie en phase gazeuse de chaque fraction identifiée a permis l'analyse spécifique de leur composition en acides gras. Ceci est rendu possible par la non-destruction de l'échantillon et correspond à une confirmation des résultats de CCM-DIF.

✓ **Mode opératoire :**

Des plaques de silice (20cm x 20cm x 0,5mm) ont été utilisées à cet effet (Silicagel 60, Merck, Darmstadt, Allemagne). Après activation de la plaque à 103°C pendant 30 min., les lipides totaux extraits par la méthode de Bligh et Dyer (50mg/ml, solvant chloroforme/méthanol (2/1)) ont été déposés à l'aide d'une pipette pasteur. Le solvant ayant permis la dissolution des échantillons a alors été évaporé, puis les plaques ont été placées dans des cuves de migration contenant un solvant d'élution hexane/éther diéthylique/acide formique (80/20/0,1). La séparation des constituants des lipides totaux a alors lieu lors de la migration (30 min, 20°C).

Après cette migration, les différentes fractions des lipides totaux ont été révélées à l'aide d'un réactif spécifique des lipides (solution de 1-3 dichlorofluorescéine à 0,5% dans du méthanol). La pulvérisation de cette solution puis le séchage de la plaque, ont permis par observation sous UV de révéler les différentes fractions lipidiques et leur identification par rapport à des standards. Les différentes fractions obtenues ont été alors récupérées par grattage de la plaque à l'aide d'une spatule. Ces dernières, après désorption de la silice, ont subi le protocole d'estérification selon la méthode de Lepage et Roy, (1986) en raison de la faible quantité d'échantillon récupérée. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des différents échantillons a alors lieu afin de déterminer la composition des différentes fractions en acides gras.

3. Hydrolyse aqueuse et enzymatique de la graine de colza en vue de l'extraction de l'huile.

3.1. Présentation des enzymes testées

Les enzymes utilisées lors de cette étude sont de qualité alimentaire et conformes aux spécifications recommandées par la législation (Journal Officiel de la République Française, arrêté du 14 novembre 2001 modifiant l'arrêté du 21 décembre 1988). Cet arrêté est relatif aux hydrolysats de protéines dans la fabrication des aliments destinés à une alimentation particulière ainsi qu'à la réglementation des produits.

Quatre protéases et trois polysaccharides hydrolases ont été testées afin d'optimiser la libération de l'huile incluse dans les corps lipidiques de la graine. Les propriétés de ces enzymes sont résumées dans les sous-chapitres suivant.

3.1.1. Les enzymes protéolytiques.

L'Alcalase[®] 2,4L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danemark) est utilisée sous forme de préparation enzymatique liquide. Cette endopeptidase à sérine est produite à partir d'une souche sélectionnée de *Bacillus licheniformis*. Son activité standard est de 2,4 unités Anson/g (AU/g) d'enzyme. Son activité optimum est obtenue entre pH 6,5 et 8,5 pour des températures de 50 à 65°C (substrats de nature diverses tels que protéines de soja ou caséines), ce qui correspond aux conditions utilisées lors de l'étude pH 8, 60°C. Cette enzyme, aussi dénommée subtilisine de Carlsberg, appartient à la famille des subtilisines (EC.3.4.21.14a). Son activité consiste en l'hydrolyse des liaisons peptidiques mais peut aussi correspondre à la catalyse des réactions de transestérification et de transpeptidation. Elle est connue pour avoir une spécificité d'action plus large que d'autres protéases comme la trypsine (Walsh et Wilcox, 1970) mais elle a toutefois une spécificité marquée pour les liaisons peptidiques dans lesquelles la fonction carboxylique est portée par les acides aminés hydrophobes (Cowan, 1983).

La Neutrase[®] 0,8L (EC.3.4.24.4f, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danemark) est utilisée sous forme de préparation enzymatique liquide. C'est une endopeptidase à Zn (métalloprotéase) produite à partir d'une souche sélectionnée de *Bacillus amyloliquefaciens*. Son activité standard est de 0,8 AU/g. L'optimum d'activité est obtenu pour un pH compris entre 5,5 et 7,5 et une température allant de 40 à 55°C en fonction du substrat. Cette enzyme hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles le groupement aminé est porté par un acide aminé hydrophobe comme la leucine, la valine, l'isoleucine et la norceuline ainsi que les

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

liaisons dont le groupement carboxylique est porté par la proline. Les conditions définies lors de l'étude pour l'utilisation de cette enzyme sont pH 7,5 et 50°C.

La Flavourzyme[®] 1 L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danemark) est une enzyme fongique produite à partir d'une souche d'*Aspergillus oryzae*. Elle est douée à la fois d'activité endo et exo-protéasique. Son activité standard est de 1 LAPU / g d'enzyme (Unité Leucine aminopeptidase). Son optimum d'activité est obtenu pour un pH de 5,5 à 8 pour des températures allant de 35 à 55°C. Lors des réactions, elle est utilisée à un pH de 7,5 et 50°C.

La Protamex[®] (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danemark) est utilisée sous forme de microgranules. C'est une endoprotéase produite à partir d'une souche sélectionnée de *Bacillus subtilis*. Son activité standard est de 1,5 AU/g. Les conditions d'activité maximale sont obtenues à pH 5,5-8,5 et une température comprise entre 40 et 60°C.

Les unités de mesure d'activité

Il n'existe pas dans les fiches de données producteur d'homogénéité pour la mesure de l'activité des enzymes utilisées. Dans un souci de compréhension, le détail des différentes unités est défini ci-dessous.

Les activités enzymatiques de l'Alcalase[®] de la Neutrase[®] et de la Protamex[®] sont définies en termes d'unités Anson (UA) par la méthode dite Anson/hémoglobine modifiée par le laboratoire Novozymes A/S en 1978. Lors de la détermination des activités protéolytiques l'hémoglobine est dénaturée et digérée dans des conditions standards (pH 7,5, 25°C, 10 min). La partie non digérée de l'hémoglobine après action enzymatique est précipitée à l'aide d'acide trichloroacétique (TCA). Un dosage spectrophotométrique à 750 nm à l'aide du réactif de phénolique de Folin-Ciocalteu permet alors le dosage de la phase insoluble. L'UA correspond alors à la quantité d'enzyme qui sous des conditions standards produit un milli-équivalent Tyrosine par minute à partir d'hydrolysate de l'hémoglobine soluble dans TCA (Anson, 1939 ; Tang *et al.*, 1979).

La seconde unité utilisée est l'unité leucine aminopeptidase (LAPU). Elle est adoptée pour la Flavourzyme[®] et correspond à la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 mmole de L-leucine-p-nitro-anilide (substrat particulier de l'enzyme) par minute selon la méthode analytique 2004-29372-01 de Novozymes A/S.

L'ensemble des caractéristiques propres à chaque enzyme est repris dans le Tableau C 2.

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

3.1.2. *Enzymes de dégradation de la paroi cellulaire.*

De façon à favoriser la déstructuration des parois cellulaires des graines de colza, des polysaccharides hydrolases dotées d'activités variées ont été utilisées. L'action de ces enzymes est donc censé aider à la destruction de la compartimentation inhérente aux cotylédons favorisant ainsi la libération d'huile incluse. Après analyse de la littérature, trois enzymes, connues pour leur effet bénéfique voir synergique en combinaison avec des protéases, ont été sélectionnées.

La Pectinex[®] Ultra SP-L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danemark) est utilisée sous forme de préparation enzymatique liquide. Elle est douée d'activités pectinolytique et hemicellulolytique. Son activité standard est de 26,000 PG/mL (pH 3,5). Activité optimale : pH 4,5 et 35°C.

La Celluclast[®] 1,5 L FG (Novozyme A/S, Bagsvaerd, Danemark) est une cellulase fongique liquide issue d'une souche de *Trichoderma reesei*. Elle dégrade la cellulose, le cellobiose et les polymères de glucose de plus haut poids moléculaire. Son activité standard est de 700 EGU/g d'enzyme. Les conditions d'activité optimale sont obtenues à pH 4,5 et 45°C pour un substrat donné.

La Viscozyme[®] (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danemark) est un complexe multienzymatique issu d'*Aspergillus aculeatus*. Elle dégrade un grand nombre de carbohydrates notamment l'arabinose, la cellulose, le béta-glucane, l'hémicellulose et le xylose. Son activité Standard est de 100 FBG/g d'enzyme (FBG = Unité β -glucanase Fongique). Les conditions d'activité optimale sont pH 4,5 et 40°C pour un substrat donné. Le tableau qui suit reprend l'ensemble des caractéristiques des enzymes employées.

Les unités de mesure d'activité des polysaccharides hydrolases testées

L'activité de la Pectinex Ultra SP-L est définie en termes d'unité PG/ml (unité polygalacturonase). Ceci correspond à la mesure de réduction de viscosité d'une solution d'acide pectique à 20°C et pH 3,5 qui est proportionnelle à l'activité enzymatique. Par comparaison à la réduction de viscosité obtenue à l'aide de standards propres à l'entreprise Novozymes A/S, l'activité enzymatique est quantifiée.

Pour la Celluclast[®], l'unité utilisée est L'EGU (Unité endoglucanase). L'enzyme est incubée avec de la carboxyméthylcellulose intervenant en tant que substrat. La dégradation de ce

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

substrat conduit à une réduction de viscosité qui est mesurée à l'aide d'un viscosimètre à arbre vibratoire. Cette réduction de viscosité est proportionnelle à l'activité endoglucanase. Par comparaison avec la réduction de viscosité obtenue à l'aide de standard propre à l'entreprise Novozymes A/S l'activité enzymatique est déterminée. La définition donnée est la suivante : L'EGU est mesurée de façon relative à des standards Novozymes A/S (Fiche: EB-SM-0275.02/01).

Pour la Viscozyme[®], l'unité d'activité donnée par le producteur est l'unité FBG (Unité B-glucanase fongique). Les β -glucanases fongiques réagissent avec les β -glucanes en formant du glucose et des sucres réducteurs dont la concentration est déterminée de façon spectrophotométrique par la méthode de Somogyi-Nelson. Une unité FBG correspond alors à la quantité d'enzyme qui sous des conditions particulières ([S] : 0,5%, T° : 30°C, pH :5, 30 min) libère du glucose ou des sucres réducteurs avec une réduction de capacité équivalente à 1 μ mole de glucose par minute.

Tableau C-2 : Caractéristiques des enzymes utilisées.

enzymes	source	conditions optimales		ratio E/S	activité déclarée	activité de l'enzyme
		en fonction de substrats spécifiques				
		pH	T (°C)			
Alcalase [®] 2.4L	<i>Bacillus licheniformis</i>	6,5-8,5	50-65	3	2,4 AU/g	endoprotéase à Sérine
Neutrase [®] 0.8L	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5,5-7,5	40-55	3	0,8 AU/g	endoprotéase à Zn
Protamex [®]	<i>Bacillus subtilis</i>	5,5-8,5	40-60	3	1,5 AU/g	endoprotéase
Flavourzyme [®]	<i>Aspergillus oryzae</i>	6,5-8	35-55	3	1 LAPU/g	endo et exopeptidase
Celluclast [®]	<i>Trichoderma reseei</i>	4,5-5,5	55-65	1	26000 PG/ml	cellulase
Pectinex Ultra SP [®]	<i>Aspergillus aculeatus</i>	4-5	30-40	1	700 EGU/ml	xylanase pectinase cellulase
Viscozyme [®]	<i>Aspergillus aculeatus</i>	3,3-5,5	35-55	1	100 FBG/g	pectinase, β -glucanase, cellulase, xylanase, arabanase

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

3.1.3. Inactivation des enzymes.

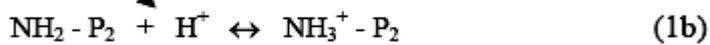
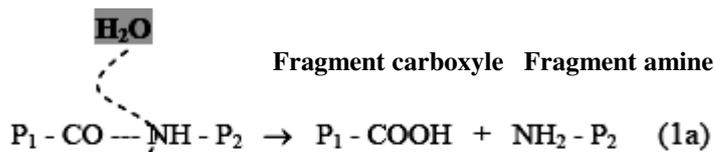
Chaque enzyme a un mode spécifique d'inhibition. Le tableau qui suit reprend l'ensemble des conditions de pH et de température permettant la cessation de l'activité enzymatique (Note Novozymes B 163j-GB). L'ensemble des conditions utilisées lors des expérimentations apparaît de façon surligné.

enzymes	pH	température (°C)	temps (min)
<i>Alcalase</i> [®]	4	50	30
	8	85	10
<i>Flavourzyme</i> [®]	4	85	5
	7	85	5
<i>Neutrase</i> [®]	4	50	30
	7	80	4
<i>Protamex</i> [®]	4	50	30
	8	85	10
<i>Celluclast</i> [®]	pH réaction	85	10
<i>Viscozyme</i> [®]	pH réaction	85	10
<i>Pectinex</i> [®] Ultra SP L	pH réaction	85	10

d'après la note Novozymes B 163j-GB

3.1.4. Cinétique de la protéolyse.

En général les réactions de protéolyse peuvent être schématisées de la façon suivante :



et



En accord avec Svendsen, 1976 et Adler-Nissen, 1986, il est généralement accepté que les enzymes de type sérine protéase comme l'Alcalase[®] suivent la loi de Michaelis-Menten (voir équation 2, Segel, 1975).

$$V = \frac{k \cdot E \cdot N}{K_M + N} \quad \text{Équation 2}$$

Postolache et Oncescu, 1989 ont caractérisé l'hydrolyse de caséines et de l'hémoglobine par l'Alcalase® en accord avec l'équation de Michaelis-Menten.

D'un autre côté, il peut être attendu que le substrat original et certains des peptides continuellement libérés durant le procédé d'hydrolyse peuvent entrer en compétition au niveau du site actif de l'enzyme.

Adler-Nissen (1986) et González-Tello *et al.* (1994) ont aussi pondéré leurs résultats par la possibilité d'une inhibition par le produit de la réaction. L'équation 3 montre un mécanisme de type Michaelis-Menten avec une inhibition compétitive (Segel, 1975).

$$V = \frac{k \cdot E \cdot N}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + N} \quad \text{Équation 3}$$

Avec N la concentration molaire des liaisons peptidiques dans un substrat pouvant être hydrolysé par l'Alcalase®; I la concentration molaire de l'inhibiteur et k, K_M et K_I les paramètres de la cinétique enzymatique.

3.2. Protocole des extractions aqueuses assistées par les enzymes.

3.2.1. L'hydrolyse des graines.

400 g de graines sont broyées à sec pendant 90s puis aliquotées par tranche de 50g qui serviront aux réactions. Après inactivation thermique des enzymes endogènes (85°C, 10 min) au four à micro-ondes (puissance restituée : 800W) et ajout d'eau (ratio graine / H₂O : 1/4), le mélange est introduit dans un réacteur. Les paramètres de température, de pH et de concentration sont alors ajustés afin d'obtenir les conditions optimales d'utilisation de chaque enzyme pour le substrat. La zone d'étude est décrite dans les fiches techniques de Novozymes A/S (Bagsvaerd, Danemark). L'hydrolyse enzymatique est ensuite contrôlée par la méthode du pH-stat afin de mesurer le degré d'hydrolyse lors de l'action des protéases. De plus, les réactions de dégradation des parois cellulaires sont suivies par un paramètre indirect qui est l'apparition de l'azote soluble dans la phase aqueuse après centrifugation du milieu (Wanasundara et Shahidi, 1997) Le dosage de l'azote est effectué par l'utilisation d'un

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

appareil de microanalyse de type Vapodest 4S Gerhardt (AOAC 1997) (cf. *Matériels et Méthodes* 1.2.5.).

En fin de réaction enzymatique, le bilan massique des différentes fractions obtenues après centrifugation est réalisé. De plus, la teneur en lipides totaux des différentes fractions est mesurée par la réalisation d'extractions chimiques selon Bligh & Dyer (1959) (cf. *Matériels et Méthodes* 1.2.6.1.).



Figure C-7 : Photographie du réacteur permettant l'hydrolyse du milieu.



Figure C-8 : Montage utilisé lors du suivi du degré d'hydrolyse.

3.2.2. Centrifugation et répartition des fractions.

Le milieu d'hydrolyse est récupéré et centrifugé dans une centrifugeuse de type Sigma 301 (Bioblock) pendant 10 minutes à 6000 min^{-1} (RPM). On obtient alors cinq fractions dans le pot de centrifugation.

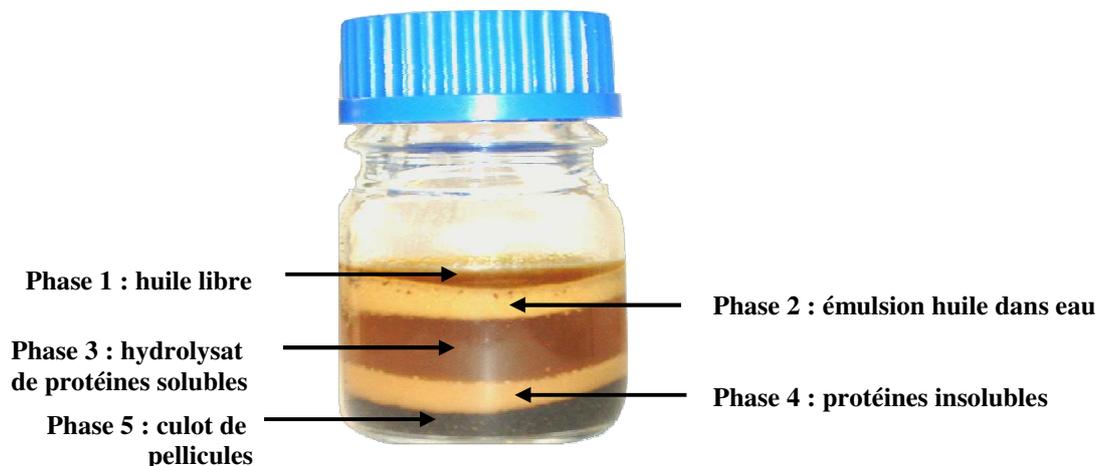


Figure C-9 : Schéma représentatif du fractionnement du milieu réactionnel après centrifugation

Les phases 1 (huile libre), 4 (protéines insolubles) et 5 (culot de pellicules) correspondant à une partie de l'hydrolysate sont alors récupérées de façon séparées à l'aide d'une micropipette

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

et d'une spatule (les noms des fractions correspondent aux composés majoritaires de celles-ci). Les phases 2 et 3 sont à nouveau centrifugées et récupérées de façon séparée à l'aide d'une micropipette. Chaque fraction est alors pesée afin d'effectuer le bilan massique. De plus, l'analyse de la teneur en lipides totaux par la méthode de Bligh & Dyer (cf. : 2.4.3) est effectuée sur les fractions émulsion huile dans l'eau, protéines insolubles et culot, pellicules. L'analyse de la teneur en protéines est alors réalisée pour la fraction 3 par la méthode de Kjeldahl.

3.2.3. Protocole expérimental.

Le schéma réactionnel qui suit reprend l'ensemble des conditions opératoires utilisées lors du traitement enzymatique.

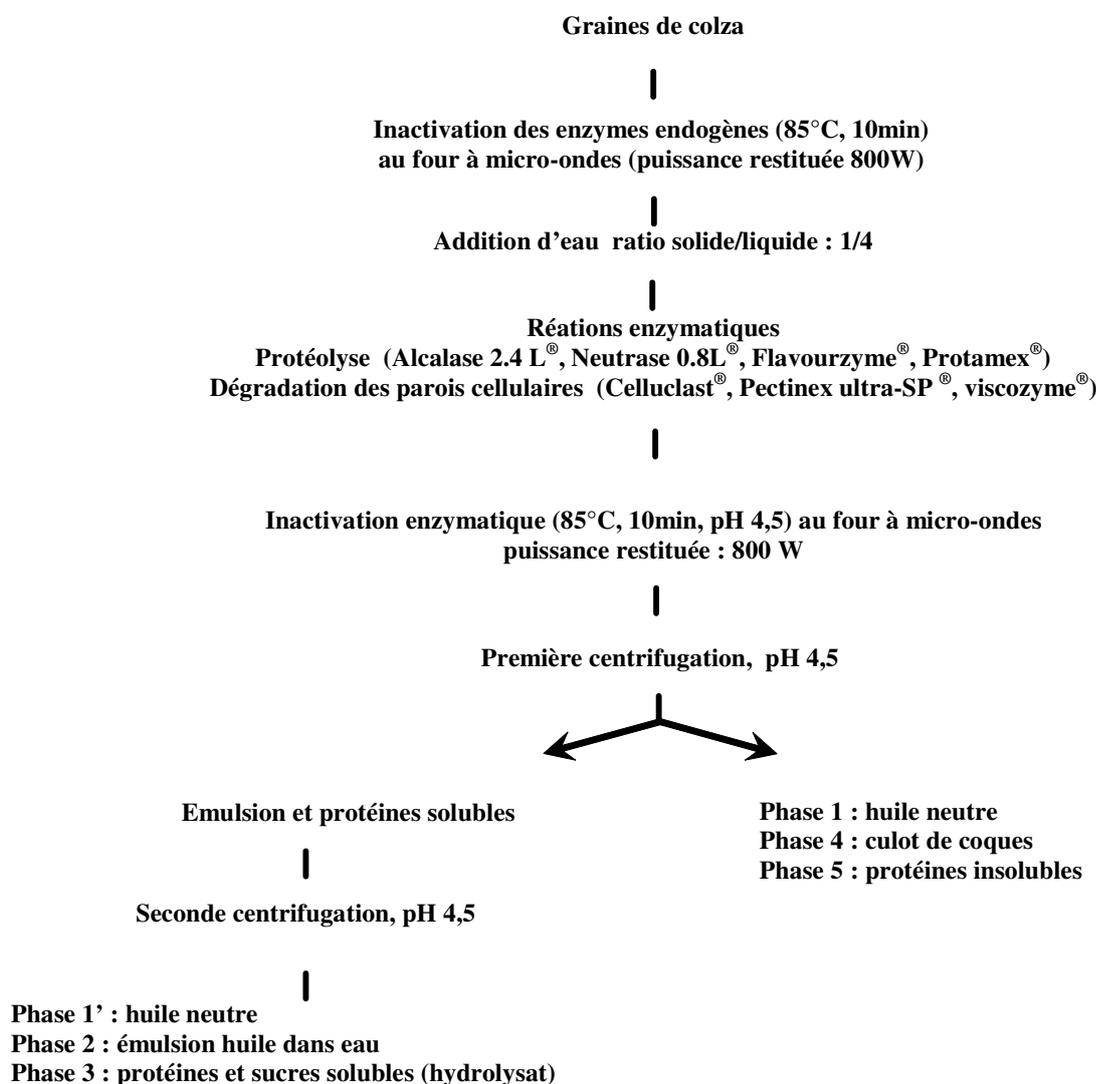


Figure C-10 : Schéma du protocole expérimental complet conduisant au fractionnement du milieu.

3.3. Suivi des réactions enzymatiques.**3.3.1. Détermination du degré d'hydrolyse pour le suivi des protéolyses.**

La méthode du pH-stat (Adler Nissen, 1977, 1986a) permet de suivre le degré de protéolyse, par le calcul du degré d'hydrolyse de l'échantillon (DH %). Ce calcul est basé sur la quantité de soude additionnée au milieu pour maintenir le pH constant. Le DH% est défini comme le pourcentage de liaisons peptidiques hydrolysées (h) sur le nombre de liaisons peptidiques totales (h_{tot}), ce dernier pouvant être caractérisé à partir de la composition en acides aminés du substrat. Le h_{tot} déterminé par la méthode TNBS sur le colza par Rozan, (1997) est de 8,0 équivalent/ kg de protéines. Dans des conditions d'hydrolyse neutre ou alcaline, la dissociation du groupement aminé devient significative entraînant alors une diminution du pH. Le calcul du DH % (Adler-Nissen, 1977 ; Linder *et al.*, 1995) est alors le suivant :

$$DH (\%) = h / h_{tot} = ((B \times NB) / (\alpha \times MP \times h_{tot})) \times 100$$

Où B : volume de solution alcaline ajoutée (ml)

NB : normalité de la solution alcaline

MP : masse de protéines (NT x 6,25) présente dans le milieu réactionnel (g)

h_{tot} : nombre total de liaisons peptidiques du substrat (meq/g de protéines)

α : degré de dissociation moyen des fonctions amines libérées

$$\text{avec } \alpha = (10^{pH-pK}) / (1+10^{pH-pK})$$

où le pK représente le pK moyen des fonctions α -aminées libérées lors de l'hydrolyse. Pour les polypeptides, le pK des groupements α -NH₂ est de 7,5 à 25°C. Il est corrigé par la formule de Steinhardt et Beychok (1964) en fonction de la température :

$$pK = 7,8 + ((298 - T) / (298 \times T)) \times 2400$$

avec T : température en Kelvin

Ces calculs ont été adaptés aux conditions d'utilisation de l'Alcalase® de la Neutrase et de la Protamex®. Le suivi du DH % pour la Flavourzyme® n'a pu être réalisé au pH optimal. Son pH optimal étant de 5,5 aucune modification du pH n'est visible car gain et perte de protons ont tendance à s'équilibrer mutuellement au cours de la réaction.

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

3.3.2. Réalisation d'un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

Une migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes a été réalisée afin de mesurer l'impact de la protéolyse sur la taille des peptides.

Pour cela 10µl de la phase hydrolysats ont été prélevés et dénaturés par chauffage à 90°C en présence de tampon de charge (5minutes) puis déposés sur un gel en double stacking. (résolution (10%) puis concentration (5%)). La migration s'est effectuée sous une tension de 80V jusqu'à ce que le front de migration arrive en bas du gel. Après fixation du gel (bain d'éthanol 25%, acide acétique 10%), la révélation a été effectuée par imprégnation au bleu de Coomassie (0,5g/l dans le mélange de fixation) puis décoloration dans l'acide acétique à 10%.

Composition du gel de résolution 10% : Acryl 30% : 3,3ml ; Tris HCl 1M (pH 8,8) :3,75ml ; H₂O : 2,09ml, SDS 10% : 100µl ; TEMED : 8µl ; Persulfate 25% : 40µl.

Composition du gel de concentration 5% : Acryl 30% : 0,83ml ; Tris HCl 1M (pH 8,8) :0,63ml ; H₂O : 3,4ml, SDS 10% : 0,05ml ; TEMED : 5µl ; Persulfate 25% : 20µl.

Composition du tampon de charge : Tris HCl pH 6,8 125mM, SDS 5% Glycérol 20% mercaptoéthanol 5% et bleu de bromophénol 0,05%.

Composition du tampon de migration : Tris/Gly(pH 8,3) SDS 0,1%.

3.3.3. Suivi de l'activité polysaccharide hydrolase (dégradation des parois cellulaires).

Le milieu étudié étant complexe, une analyse des sucres en vue de la détermination de l'activité des polysaccharides hydrolases n'était pas envisageable. Des analyses rapides permettant le suivi de l'action de ces enzymes ont donc été cherchées et pour cela un certain nombre de pistes suivies sont présentées dans les paragraphes suivants.

3.3.3.1. Suivi de la dégradation des parois cellulaires par osmolarité.

Partant du fait que la dégradation des polysaccharides liée à l'activité enzymatique du milieu allait modifier la composition de la phase aqueuse (phase 3) par libération de sucres solubles, des mesures d'osmolarité ont été réalisées afin de définir les cinétiques de dégradation.

Après réaction enzymatique puis centrifugation du milieu, 2 ml de la phase hydrolysats sont prélevés et analysés à l'aide d'un cryoscope (Fiske MS™, Massachusetts, USA).

Cet appareil a permis de déterminer le point de congélation de ces solutions en trois minutes avec une précision de $\pm 0,001^{\circ}\text{C}$.

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

Les courbes sont réalisées après calibration de l'appareil avec des solutions standard de chlorure de sodium de 100 et 500 mOsm/kg correspondant respectivement à des points de congélation de -0,185 et -0,929°C.

3.3.3.2. Mesure de la teneur en azote de l'hydrolysate.

Le suivi de la dégradation des parois cellulaires par les hydrolases de polysaccharides a été réalisé par le suivi d'un paramètre indirect : l'apparition d'azote soluble dans la phase hydrolysate.

Ceci s'explique par le fait que la dégradation des parois va favoriser la libération de protéines qui étaient contenues dans les cellules végétales et qui du fait de la compartimentation n'entraient pas dans la composition de cette phase. Cette méthode utilisée Wanasundara et shahidi, 1997 n'est certes pas directe mais elle a permis de façon simple le suivi de l'activité enzymatique dans le milieu dont la complexité empêche l'utilisation de toute autre méthode.

3.3.4. Observations microscopiques des particules résiduelles de l'émulsion.

3.3.4.1. Observation par microscopie photonique.

5 g d'émulsion sont colorés par dispersion d'une quantité infime de rouge Soudan III (colorant spécifique des lipides polaires et apolaires).

100 µl de cette émulsion sont déposés entre lame et lamelle et observés à l'aide d'un microscope de type minolta (grossissement x 10 à x 40). Des photographies sont alors réalisées à l'aide d'un appareil de type (Fujifilm, Finepix) afin de permettre une analyse plus détaillée des observations.

3.3.4.2. Observation par microscopie électronique à transmission.

✓ **Principe :**

Son principe peut être compris à partir de celui d'un microscope photonique classique : une gerbe d'électrons est condensée sur une partie d'échantillon (de l'ordre de quelques nanomètres au dixième de millimètre). Une lentille magnétique permet de former une image de l'objet avec les électrons qui interagissent fortement avec la matière traversée. L'échantillon est très mince : de 10 à 100 nm. Les électrons sont repris par un jeu de lentilles formant une image agrandie de l'objet. L'amélioration des performances par rapport à un microscope optique tient à la très faible longueur de l'onde associée à l'électron accéléré : elle

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

est de l'ordre de 1 picomètre (10^{-12} m) contre 500 à 800 nanomètres (environ 10^{-6} m) pour les photons de la lumière visible.

✓ **Mode opératoire :**

Les résidus protéiques présents dans l'émulsion ont été prélevés manuellement au niveau de l'émulsion après les différentes étapes du procédé d'extraction afin d'estimer par microscopie électronique à transmission l'impact des procédés sur la structure des fragments de graines. La coloration a été réalisée selon la méthode employée par Ponne *et al.*, 1996.

Les résidus des graines sont introduits dans un milieu de fixation à base de formaldéhyde à 2% et de glutaraldéhyde 3% dans un tampon phosphocitrate (pH 7,2) et incubés à 4°C pendant 6 jours. Après fixation, les fragments de graine sont rincés 5 fois dans le tampon pendant 5 min. La coloration des lipides de la graine est alors réalisée par une seconde fixation dans de l'oxyde d'osmium à 1% pendant 1 heure à température ambiante. Les graines sont alors rincées et purifiées dans l'eau et déshydratées par des bains dans une série de gradients d'éthanol. Les graines sont alors fixées dans de la résine Epon. Les échantillons sont alors coupés en couches ultrafines de 80 nm à l'aide d'une lame de diamant (ultramicrotome : ultracut E ; Reichert-Jung, Wien, Autriche). Les coupes sont alors récupérées sur des grilles de cuivre de 100 mesh et lavées à l'acétate d'uranyl 2%. La microstructure de la graine est alors étudiée à l'un d'un microscope de type Philips EM 400.

3.4. Réactions d'hydrolyses testées.

Afin de déterminer quelles enzymes aller être utilisées lors des réactions d'hydrolyse et d'optimiser le protocole enzymatique d'extraction de l'huile, différentes combinaisons enzymatiques ont été testées :

Dans un premier temps, chaque type d'enzyme (protéases et enzymes de dégradation de la paroi cellulaire) a été employé. Par la suite, leur ordre et leur combinaison ont varié. Les tests effectués ont donc été les suivants :

- ✓ Protéases seules
- ✓ Polysaccharides hydrolases seules
- ✓ Protéases puis polysaccharides hydrolases
- ✓ Polysaccharides hydrolases puis protéases

3.5. Analyse des fractions après centrifugation.

3.5.1. Détermination de la teneur en lipides totaux et en azote.

Les méthodes utilisées pour déterminer la composition en lipides totaux et en azote des fractions sont identiques à celles employées lors de l'étude de la graine.

3.5.2. Analyses physicochimiques des lipides totaux.

La teneur en lipides totaux des fractions a été déterminée après obtention des lipides totaux par la méthode de Bligh & Dyer (1959) et la détermination des classes lipidiques de chaque fraction a été réalisée par Iatroscan et CPG (chapitre *Matériels et Méthodes* 1.2.6.1, 2.9, 2.10).

De façon complémentaire, l'analyse par calorimétrie différentielle des lipides totaux obtenus a été effectuée.

3.6. Caractérisation de l'émulsion.

3.6.1. Microscopie photonique.

5 g d'émulsion sont colorés par dispersion d'une quantité infime de rouge Soudan III (colorant spécifique des lipides polaires et apolaires).

100 µl de cette émulsion sont déposés entre lame et lamelle et observés à l'aide d'un microscope de type minolta (grossissement x 10 à x 40). Des photographies sont alors réalisées à l'aide d'un appareil de type (Fujifilm, FinepixZ1) afin de permettre une analyse plus détaillée des observations.

3.6.2. Diffusion statique de la lumière : mesure de la taille des particules de l'émulsion.

✓ Principe.

La granulométrie LASER repose sur la diffusion statique de la lumière. Les échantillons à analyser sont mis en circulation devant un faisceau laser. Quand les particules passent devant ce faisceau, elles dévient la lumière de son axe principal (déviations liées au changement d'indice de réfraction du milieu traversé par la lumière). La quantité de lumière déviée et l'importance de la déviation dépendent de la taille des particules. Ainsi, les particules de grande taille dévient une quantité de lumière importante sur des angles faibles par rapport à l'axe de propagation. Au contraire, les particules de petite taille dévient une quantité infime de lumière sur des angles beaucoup plus larges. En assimilant les particules à des sphères lisses, les équations proposées par la théorie de Mie permettent alors de déterminer la répartition granulométrique de l'échantillon analysé.

✓ Mode opératoire.

Les mesures granulométriques ont été réalisées à l'aide d'un granulomètre de Type Mastersizer S (Malvern Instruments, Orsay, France). Cet appareil est équipé d'un faisceau laser de faible puissance (5 mW), issu d'un tube Hélium – Néon émettant une lumière rouge (632,8 nm). La cellule de mesure utilisée présente une épaisseur de 2,4mm et est associée à une lentille de type 300RF permettant la mesure de la taille de particules dont le diamètre est compris entre 0,05 et 880 µm.

Après alignement du faisceau laser, la mesure du bruit de fond a été réalisée sur 100ml d'eau. 100 µl d'échantillon à analyser ont ensuite été incorporés dans l'unité de dispersion (Malvern DIF2025, agitation 2400 tr / min limitant la sédimentation) afin d'obtenir un taux d'obscurité compris entre 15 et 20 %. L'analyse granulométrique a ensuite été lancée par

Caractérisation de l'émulsion

l'intermédiaire de l'interface logiciel Sv2.17 (Malvern Instruments, Orsay, France). Chaque mesure durant 10 secondes a fait l'objet de 21 répétitions (intervalles de mesure) afin de s'affranchir d'une éventuelle modification du milieu en fonction du temps. Les données brutes provenant de l'unité optique ont alors été traitées par ce même logiciel afin de définir les courbes de distribution granulométriques du milieu (trois répétitions par échantillons). Les indices de réfraction du milieu continu et de l'échantillon à analyser utilisés en vue de la résolution de l'équation de Mie ont été respectivement les suivants 1,33 et 1,457. Il est important de noter que l'indice de réfraction du milieu discontinu utilisé lors de l'étude est celui de l'huile de colza et non celui de l'émulsion du fait de la difficulté à évaluer l'indice de réfraction d'un milieu complexe.

3.6.3. Viscosité de l'émulsion

Une analyse rhéologique a permis de déterminer les caractéristiques d'écoulement de l'émulsion et celles des lipides obtenus par extractions enzymatiques ou chimiques (Bligh & Dyer).

✓ **Mode opératoire:**

Après récupération de l'émulsion puis filtration grossière de cette dernière afin d'ôter les particules de graine résiduelles, l'analyse rhéologique de l'émulsion a été réalisée à l'aide d'un appareil de type Rheologica (Reologica Instruments, Lund, Suède).

Les mesures de viscosité ont été réalisées à l'aide d'un système de mesure en polycarbonate de type cône plan (C40 4, Reo Logica Instruments, Lund, Suède) en maintenant une température constante de 20°C à l'aide d'un régulateur de température Jumo (Sciencetec, Les Ulis, France).

Pour ces mesures, 1,17 ml d'émulsion sont déposés puis après fixation des contraintes de cisaillement l'analyse est lancée par le système guidé par le logiciel Stresstech (Reologica Instruments, Lund, Suède). Lors de ces essais, trente contraintes de cisaillement allant de 0,5 à 1 Pa ont été appliquées (intervalles de mesure 1s).

Les résultats obtenus (viscosité et vitesse de cisaillement) sont alors récupérés puis traités afin de déterminer les propriétés rhéologiques de l'émulsion. Les courbes obtenues discutées dans le paragraphe Résultats et Discussion représentent la moyenne de trois essais indépendants et leur écart-type associé.

Caractérisation de l'émulsion

3.6.4. Conductivité de l'émulsion.

Les émulsions ont été analysées par conductivité ce qui est considéré comme la technique la plus sensible pour déterminer les altérations physiques de l'émulsion (Delonca et Passet, 1973 ; Pearce et Kinsella, 1978 ; Kato *et al.*, 1985 ; Latreille et Paquin, 1990, Masmoudi *et al.*, 2005).

La conductivité de chaque échantillon a été mesurée à l'aide d'un conductimètre de type (Cyberscan 500, Eutech instruments, Singapour) à 25°C. Chaque mesure de conductivité a été réalisée à deux niveaux de l'émulsion : en surface et au fond de l'échantillon. Les modifications des résultats obtenus peuvent permettre la détection du crémage, de la sédimentation et de l'inversion de phase (Martini et Seiller, 1999). D'après la littérature, (Delonca et Passet, 1973 ; Pearce et Kinsella, 1978 ; Kato *et al.*, 1985 ; Latreille et Paquin, 1990), la conductimétrie est souvent utilisée pour déterminer la nature d'une émulsion et pour contrôler sa stabilité dans le temps. A l'heure actuelle, cette méthode est considérée comme l'une des plus sensible aux changements de la structure de l'émulsion.

4. Essais de déstabilisation de l'émulsion.

Après avoir déterminé l'ensemble des paramètres permettant l'obtention d'une quantité d'huile optimale dans les deux phases supérieures (huile libre et émulsion huile dans eau), des tentatives de déstabilisation de l'émulsion ont été réalisées.

L'ensemble des essais, lorsque seule l'émulsion est traitée, ont été réalisés sur des émulsions préparées grâce à l'action de l'Alcalase[®] (3% E/S ; pH : 8 ; T° : 60°C ; 1H 30) et de la Neutrase[®] (1,5% E/S ; pH : 7,5 ; T° : 45°C ; 1H 30).

4.1. Déstabilisation physicochimique.

4.1.1. Déstabilisation par addition d'alcool.

A une masse donnée d'émulsion, on ajoute de l'éthanol (3% p/p). L'émulsion est alors centrifugée (10min ; 6000trs / min ; 20°C). Sa surface est observée et l'on récupère la fraction d'huile libérée à l'aide d'une micropipette. Le bilan en huile libérée est alors réalisé.

4.1.2. Déstabilisation par addition de sel (NaCl).

5%(p/p) de NaCl sont additionnés à l'émulsion. Après homogénéisation et centrifugation de l'émulsion (10min, 6000trs/min, 20°C). On récupère alors l'huile libre après observation de la surface de l'émulsion.

4.1.3. Déstabilisation par addition d'acide phosphorique.

3%(p/p) d'acide phosphorique sont additionnés à l'émulsion. Après homogénéisation (10 min) et centrifugation de l'émulsion (10min, 6000trs/min, 20°C). On évalue alors l'impact de ce traitement en observant sa surface et en faisant le bilan de l'huile libre libérée.

4.1.4. Déstabilisation par addition d'acide citrique.

3%(p/p) d'acide citrique sont additionnés à l'émulsion. Après homogénéisation et centrifugation de l'émulsion (10min, 6000trs/min, 20°C). La déstabilisation de l'émulsion attendue est alors mesurée par quantification de l'huile libre récupérée.

4.1.5. Déstabilisation par lavage de l'émulsion.

On place une fraction d'émulsion dans une éprouvette graduée. Après addition d'environ cinq volumes d'eau bouillante, l'émulsion stabilisée à la surface de l'éprouvette est récupérée puis centrifugée (10min, 6000trs/min, 25°C). La quantification de l'huile libérée est alors effectuée après observation visuelle de la surface.

4.1.6. Déstabilisation par ajout de talcs.

Les talcs sont apportés au milieu réactionnel après récupération de l'émulsion (traitement classique, deux centrifugations). Une étape d'homogénéisation est alors effectuée sur

Essais de déstabilisation de l'émulsion

l'émulsion complétée en eau (1 masse d'émulsion/ 2 masses d'eau) et en talc à l'aide d'un agitateur pendant trente minutes. Trois talcs avec des aires spécifiques et des compositions variées (Tableau C 3) ont été testés à deux concentrations différentes (1 et 2% p/p). Le milieu est alors centrifugé (sigma 2-15, Bioblock Scientific, 15 min, 4500 trs / min)

Tableau C-3 : propriétés spécifiques et composition des talcs utilisés.

	<i>Luzenac</i> [®]	<i>Stéamic</i> [®]	<i>Jetfine</i> [®]
<i>composition (%)</i>			
<i>SiO2</i>	58,4	56	61
<i>MgO</i>	31,7	31	31,5
<i>Al2O3</i>	2,3	3,6	0,7
<i>Fe2O3</i>	0,6	0,9	0,7
<i>CaO</i>	0,5	0,2	0,2
<i>aire de surface</i>			
<i>spécifique</i>	2,4	8	21
<i>(m2/g)</i>			

4.2. Déstabilisation thermomécanique.

4.2.1. Déstabilisation par dégazage.

Après réaction enzymatique une étape de dégazage à chaud (70°C, 20 minutes) à l'aide d'une pompe à vide est réalisée. Les fractions sont alors traitées comme dans le protocole de séparation classique.

4.2.2. Déstabilisation par filtration sur membrane.

Test 1:

La filtration de l'émulsion est réalisée à l'aide d'une membrane hydrophobe de type VVHP (diamètre : 47mm, pores 0,1µm, Pression : 0,8 bar) au sein d'un module d'ultrafiltration (Amicon-Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France).

La filtration est stoppée quand le flux devient nul ce qui est lié au colmatage de la membrane.

Test 2:

La filtration de l'émulsion est réalisée sur une membrane hydrophobe de type VVHP (diamètre : 47mm, pores 0,1µm, Pression : 0,8 bar) au sein petit module d'ultrafiltration.

Après colmatage de la membrane, de l'eau bouillante est additionnée.

Test 3:

Essais de déstabilisation de l'émulsion

On additionne deux volumes d'eau et dix volumes d'eau bouillante à une fraction d'émulsion.

On filtre alors ce milieu sur un verre fritté N°3.

Le filtrat obtenu est récupéré puis de nouveau filtré dans un module multi-compartiments au sein duquel sont placées : une membrane de cellulose et une membrane en polyéthersulfone (pression : 0,8 bar) (Figure C 11).

Le rétentat présent sur le verre fritté est alors traité par la méthode de Bligh & Dyer (1959) afin de déterminer le pourcentage d'huile adsorbé sur les particules solides.



Figure C-11 : Photographie du module de filtration à quatre compartiments permettant la filtration de l'émulsion.

4.2.3. Déstabilisation par congélation/décongélation.

Après différentes réactions enzymatiques résumées dans le tableau qui suit, le milieu est congelé à -30°C pendant une nuit. La suite des réactions et séparations sont alors traitées de façon classique (*cf.* B-3.2.2).

Tableau C-4 : Récapitulatif des différents traitements utilisés lors des expériences de congélation.

	traitement Alcalase®	traitement Celluclast®	congélation	traitement thermique Alcalase®	traitement thermique Celluclast®
<i>Exp1</i> <i>Alcalase®</i> , <i>congélation</i>	+	-	+	+	-
<i>Exp2</i> <i>Alcalase®</i> , <i>congélation</i>	+	-	-	+	-
<i>Exp3</i> <i>Alcalase®</i> , <i>congélation</i>	-	-	+	+	-
<i>Exp. 4</i> <i>Alcalase®</i> , <i>congélation</i>	-	-	-	+	-
<i>Exp5</i> <i>Alcalase®</i> , <i>Celluclast®</i> , <i>congélation</i>	+	+	+	+	+
<i>Exp6</i> <i>Alcalase®</i> , <i>Celluclast®</i> , <i>congélation</i>	+	+	-	+	+
<i>Exp7</i> <i>Alcalase®</i> , <i>Celluclast®</i> , <i>congélation</i>	+	-	-	+	+
<i>Exp. 8</i> <i>Alcalase®</i> , <i>Celluclast®</i> , <i>congélation</i>	-	-	-	+	+

Conditions d'utilisation des enzymes et traitement thermique associé :

Alcalase® : hydrolyse 2H à 60°C, pH : 8, Celluclast® : Hydrolyse 3H à 55°C, pH : 4,5

Les conditions écrites en rouge correspondent aux témoins :

L'inscription en rouge traitement enzymatique correspond au traitement thermique associé à l'utilisation d'enzyme en absence d'enzyme (Témoin température).

L'inscription en rouge de la congélation correspond à l'absence de congélation.

4.2.4. Déstabilisation par inversion de phase.

150ml d'émulsion diluée à l'aide d'eau (ratio émulsion/eau (1/2)) sont placés dans un réacteur à enceinte creuse dans laquelle circule de l'eau froide permettant le maintien de la température à 25°C lors de l'étape d'homogénéisation à l'aide d'un ultra-turrax (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, GMBH&Co, Allemagne). Après avoir noté la conductivité initiale de l'émulsion (Cyberscan 500, Eutech instruments, Singapour), la déstabilisation par inversion de phase est réalisée par ajout d'huile exogène (huile de colza industrielle, Winny, Allemagne) à l'aide d'une pompe péristaltique à débit constant (15 mL / min) (Easy Load, Masterflex, Millipore) de façon concomitante à l'homogénéisation (20000trs/min).

Essais de déstabilisation de l'émulsion

L'inversion de phase est détectée par la chute brutale de la conductivité du milieu. L'ajout d'huile est alors stoppé. L'ensemble du milieu est récupéré puis centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse (Sigma modèle 2-15, Bioblock Scientific, Osterode, Allemagne) à 4500 trs / min pendant 15min. La phase supérieure correspondant à une émulsion eau dans l'huile est alors récupérée puis déstabilisée par un traitement thermique au four à micro-ondes (Mafter, 30sec, puissance restituée 800W). Deux phases sont alors obtenues : une phase supérieure correspondant à l'huile libre, et la phase inférieure aqueuse. Après prélèvement et refroidissement de la phase supérieure, l'huile obtenue est quantifiée par gravimétrie par différence avec l'huile nécessaire à l'inversion de phase. Ces tests sont réalisés en présence ou absence de sel (NaCl 1M) au moment du traitement thermique lié à l'inactivation des enzymes hydrolytiques.

4.2.5. Déstabilisation par traitement ultrasons.

L'emploi des ultrasons en vue de l'augmentation du rendement en huile a été évalué à l'aide de deux types de tests (appareil utilisé : Branson Ultrasonic modèle SM35E-DTH, Danbury, USA). Tout d'abord : les ultrasons sont appliqués sur le milieu complet avant traitement enzymatique (2H, pH 5,8, puissance) et par la suite juste après l'inactivation du milieu post-traitement enzymatique et refroidissement (2H, pH 4,5, 130W). Les échantillons subissent alors une montée en température de 25°C à 40°C maximum au cours de ce traitement lié à l'utilisation des ultrasons. Les échantillons sont ensuite traités de façon classique.

5. Plan d'expériences.

5.1. Généralités.

L'objectif de ce travail été de développer un modèle descriptif prévisionnel basé sur l'expérimentation afin d'optimiser l'ensemble des réactions enzymatiques et de déstabilisation adaptées au système.

Le choix de la matrice, réseau uniforme de Doehlert, a été motivé par sa capacité à attribuer différents niveaux à chaque variable indépendantes (variable 1 : 5 niveaux, variable n à n-1: 7 niveaux, variable n : 3 niveaux) favorisant ainsi l'emploi de conditions susceptibles de parvenir à un résultat optimum.

Ce type de matrice générée par un simplex (Sado et Sado, 1991), présente une distribution uniforme de points expérimentaux dans l'espace de facteurs normés, augmentant ainsi la qualité du modèle prévisionnel. La précision du modèle peut être améliorée en fonction de la densité des points, disposés suivant un réseau rhombique. Le nombre d'expériences (N) à réaliser est déterminé par le nombre de paramètres (k) pris en compte:

$$N \geq k^2 + k + 1$$

5.2. Paramétrage et définition du domaine expérimental : Choix des variables.

A partir d'une liste non exhaustive de facteurs susceptibles d'agir sur le procédé d'extraction de l'huile par voie enzymatique, trois facteurs influents ont été retenus.

La sélection des variables à étudier a été motivée par les résultats préalables des expérimentations. Deux des enzymes utilisées donnaient déjà des résultats satisfaisants (Cellulase® et Alcalase®), c'est donc leur durée d'action qu'il était nécessaire d'optimiser. Ces deux paramètres ont été donc définis respectivement comme les variables X₁ et X₂. De plus les résultats de la congélation semblant encourageants, il était nécessaire de savoir si des congélations répétées favoriseraient l'extraction de l'huile ; c'est donc le nombre de congélation qui a été choisi comme troisième paramètre (X₃). Les niveaux des facteurs retenus pour l'optimisation du procédé d'extraction sont présentés dans le Tableau C 5.

Plan d'expériences

Tableau C-5 : Domaine expérimental et niveau des facteurs retenus pour l'optimisation du procédé d'extraction de l'huile de colza.

<i>facteurs : variables indépendantes</i>	<i>unités</i>	<i>représentation de la variable</i>	<i>valeurs expérimentales</i>	<i>niveaux</i>
<i>temps de réaction de la Celluclast® (H)</i>	min	X1	0 1 2 3 4	5
<i>temps de réaction de l'Alcalase (H)</i>	min	X2	0 0,5 1 1,5 2 2,5 3	7
<i>nombre de congélations</i>	-	X3	0 1 2	3

L'utilisation de la matrice ainsi constituée a amené à la réalisation de 13 essais distincts où les conditions expérimentales varient de façon programmée (Tableau C 6). La répétition (3 fois) de l'expérimentation 14 (14, 15, 16) a été réalisée afin de déterminer l'erreur expérimentale (analyse de variance), erreur qui est intégrée dans le calcul de l'estimation des effets des facteurs. Ces expériences ont été réalisées au centre du domaine en vue de détecter une éventuelle dérive liée au facteur temps ou à une diminution possible de l'activité de la solution enzymatique utilisée.

Tableau C-6 : Récapitulatif des essais réalisés lors du plan d'expériences.

numéro des expériences	Celluclast® (heures)	Alcalase® (heures)	congélation (nombre)
<i>1</i>	4	1,5	1
<i>2</i>	0	1,5	1
<i>3</i>	3	3	1
<i>4</i>	1	0	1
<i>5</i>	3	0	1
<i>6</i>	1	3	1
<i>7</i>	3	2	2
<i>8</i>	1	1	0
<i>9</i>	3	1	0
<i>10</i>	2	2,5	0
<i>11</i>	1	2	2
<i>12</i>	2	0,5	2
<i>13</i>	2	1,5	1
<i>14</i>	2	1,5	1
<i>15</i>	2	1,5	1
<i>16</i>	2	1,5	1

5.3. Réponses expérimentales.

Afin d'évaluer l'influence des facteurs sélectionnés sur l'optimisation de l'extraction de l'huile de colza, plusieurs réponses expérimentales ont été retenues :

- a) Le suivi du DH (%) en fonction du temps a été réalisé par la méthode du pH-Stat à 0 ; 30 ; 60 ; 90 ; 120 ; 150 ; 180 minutes en fonction des conditions opératoires.
- b) Le suivi du pourcentage de lipides dans le culot dosé par la méthode de Bligh & Dyer (1959) en fin de réaction.
- c) Le suivi du pourcentage de lipides de l'émulsion dosé par la méthode de Bligh & Dyer (1959) en fin de réaction.
- d) Le pourcentage d'huile libre dosé par méthode gravimétrique en fin de centrifugation.
- e) Le taux d'azote dans la phase hydrolysate, dosé par la méthode Kjeldhal.

Nous représenterons par η la valeur de la réponse théorique en l'absence de l'erreur expérimentale : $\eta = f(X_1, X_2, X_3)$

Chacune de ces réponses peut être représentée par une équation polynomiale du second degré valable uniquement sur l'ensemble du domaine expérimental.

$$\eta_j = \beta_{j0} + \sum_{i=1}^3 \beta_{ji} X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{jii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{jij} X_i X_j$$

5.4. Optimisation du procédé d'extraction de l'huile.

Le but de l'optimisation consiste à trouver l'ensemble des variables opératoires qui entraînent un état souhaité pour le système. Deux des facteurs seront particulièrement intéressants : le pourcentage de lipides dans le culot que l'on doit minimiser et le pourcentage d'huile libre qui doit être optimal afin de permettre la libération effective de la plus grande quantité de lipides possible.

A partir du modèle polynomial il est possible de prédire des réponses pour différentes valeurs expérimentales comprises dans le domaine d'étude défini. Le tracé des isoréponses, définies comme des courbes de niveau, permet de visualiser à l'intérieur du domaine expérimental, toutes les conditions opératoires qui amènent une réponse identique pour un facteur de réponse défini. On définit donc comme isoréponses, les courbes de niveau de la surface de réponse telles que la fonction $Y = (X_1, X_2, \dots, X_k)$ soit égale à une constante. Les courbes

Plan d'expériences

isoréponses sont représentées en fonction des différentes variables, en tenant compte de deux paramètres, le troisième étant généralement maintenu au centre du domaine.

En fonction du nombre de facteurs, z couples de paramètres possibles permettent de tracer z surfaces de réponses pour chaque réponse expérimentale étudiée. Les représentations graphiques des surfaces de réponse sont obtenues en générant par le logiciel NEMROD (Mathieu et Phan-Tan-Luu, 1997), autant de diagrammes qu'il y a de couples de facteurs différents et de valeurs imposées à l'autre variable. La représentation du chemin optimal permet quand à elle de prendre en compte l'ensemble des paramètres et de représenter le sens dans lequel les faire varier afin d'obtenir le résultat escompté.

Résultats et discussions

Une analyse globale de la graine, ayant pour but de définir l'ensemble des caractéristiques de cette dernière, a tout d'abord été réalisée. Cette détermination de l'ensemble des composants en présence a permis de régler un certain nombre de paramètres expérimentaux tels que l'ajustement de la concentration en enzymes, le ratio solide / eau. D'autre part, une bonne connaissance du substrat de l'étude a aidé à mieux comprendre et appréhender les mécanismes survenant au cours du procédé d'extraction aqueuse de l'huile.

1. CHAPITRE I : Conservation et caractéristiques physicochimiques de la graine, qualité de l'huile

1.1. Conservation de la graine.

La graine a été conservée sous de faibles concentrations en oxygène au sein d'un emballage hermétique et dans une salle à 4°C, en absence de lumière (Chapitre *Etat de l'art* 1.2.1). Ceci se rapproche des conditions déterminées par Pekrun *et al.*, 1997 qui ont démontré que ce type de traitement pouvait induire une dormance secondaire pour des graines de *Brassica napus*. Par conséquent, on peut supposer que la conservation a lieu dans des conditions favorables visant à limiter les flux de carbone et permettant d'obtenir une composition constante de la graine tout au long des travaux (Geigenberger, 2003 et Vigeolas *et al.*, 2003).

1.2. Détermination du pourcentage d'humidité de la graine.

Le pourcentage d'humidité de la graine a été mesuré par deux méthodes : la méthode titrimétrique de Karl-Fischer et la méthode par étuvage (Chapitre *Etat de l'art* 1.2.1). Des tests de broyage (temps : 45 ou 90 s) ont été réalisés afin de définir si la finesse des particules pouvait avoir un impact sur les résultats de la teneur en eau de la graine lors de l'étuvage. L'ensemble des résultats est récapitulé dans le Tableau D 1.

Tableau D-1 : Teneur en eau de la graine expérimentale par les méthodes de Karl-Fischer et par étuvage.
* moyenne de 6 résultats, ** moyenne de 13 résultats

méthode	étuvage 4h broyage : 45s	étuvage 4h broyage : 90s	Karl-Fischer broyage : 90 s
<i>moyenne de la teneur en eau (g/100g de graines)</i>	7,4 *	7,2 *	6,6 **
<i>écart-type</i>	0,4	0,2	0,3

Caractérisation des constituants de la graine de colza

Sur ce tableau, on peut remarquer que les résultats correspondant à la méthode de Karl-Fischer sont légèrement inférieurs à ceux obtenus par étuvage. Ceci peut être lié au fait que la méthode de Karl-Fischer ne dose que l'eau libre de la graine alors que la méthode par étuvage peut aussi intégrer une partie de l'eau liée. On peut toutefois remarquer que ces deux valeurs sont très proches.

Les résultats montrent également qu'il existe une légère différence entre les résultats des deux expériences par étuvage, ce qui peut s'expliquer par la finesse du broyage des graines et/ou par une répartition plus homogène des particules obtenues lors d'un broyage plus conséquent. Un cycle long de broyage améliore la répétitivité des résultats, ce qui se traduit par un écart-type plus faible. C'est donc la valeur par étuvage après un broyage de 90 s qui doit être prise en compte lorsque l'on veut s'approcher de la valeur vraie de l'humidité de la graine.

D'autre part, d'après Thiex et Richardson, 2003, qui comparent dans leur étude les méthodes utilisées pour mesurer le pourcentage d'humidité de la graine de colza, la méthode de Karl-Fischer reste la méthode de choix pour déterminer la teneur en eau. De ce fait, pour tous les ajustements des paramètres expérimentaux utilisés faisant intervenir la teneur en eau de la graine, ce sont les résultats obtenus par la méthode de Karl-Fischer qui ont été utilisés. En effet, ces résultats permettent une appréciation précise de l'eau « réactive » (non liée) de la graine soit $6,61 \pm 0,29$ g / 100 g de graines. De plus, ils concordent avec l'ensemble des résultats trouvés dans la littérature qui estiment que le taux d'humidité de la graine de colza se situe entre 6 et 7% (Bell, 1984 et 2001).

1.3. Evaluation de la teneur en lipides totaux de la graine.

Après optimisation du procédé d'extraction de l'huile par Soxhlet à l'éther de pétrole (évaluation du temps de broyage nécessaire : 90s et du temps d'extraction nécessaire : 7h00), la teneur en lipides totaux de la graine a été définie comme :

$$\% L_t = 41,7 \pm 0,1 \text{ g / 100 g de graines soit } 44,7 \text{ g / 100 g de MS}$$

(Chapitre *Etat de l'art* 1.2.6.2).

D'autres méthodes d'extraction ont été testées et conduisent aux résultats suivants :

- ✓ Extraction par la méthode de Bligh & Dyer : $\% L_t = 42,5 \pm 0,5$ g/100 g de graines soit 45,5 g / 100 g de MS (Chapitre *Etat de l'art* 2.6.1).
- ✓ Extraction au butanol saturé en eau chaude : $42,3 \pm 0,4$ g/100g de graines soit 45,3 g / 100g de MS (Chapitre *Etat de l'art* 1.2.6.3).

Caractérisation des constituants de la graine de colza

Ces résultats concordent avec la globalité des valeurs obtenues dans la littérature (Bell, 1984 et 2001 ; Eskin, 1996) qui annoncent une teneur en huile de 38 à 42 %. Les légères différences obtenues par le biais des diverses méthodes d'extraction peuvent provenir :

- de l'affinité relative des solvants utilisés pour les composants mineurs des huiles,
- de la solubilité des composés lipidiques dans les solvants utilisés,
- voire de l'affinité de certains des solvants pour des composés non lipidiques (Shahidi et Wanasundra, 2002 ; Delbeke *et al.*, 1995 ; Smedes et Thomasen, 1996).

La méthode de Bligh & Dyer est reconnue comme l'une des méthodes de choix pour l'extraction des composés polaires et non polaires des huiles (Smedes et Aksland, 1999). De ce fait, et du fait de sa rapidité de réalisation, cette méthode a été retenue lors des travaux qui ont suivi. L'ensemble des lipides obtenus par la suite ont alors été analysés par chromatographie en phase gazeuse afin de déterminer leur composition en acides gras.

En raison de la difficulté à obtenir des résultats répétables lors de la réalisation de cette méthode, une attention particulière a été prise lors des extractions. Le volume de méthanol, déterminant lors de telles extractions, a donc été maintenu constant (Smedes et thomasen, 96 ; Smedes et Aksland, 1999 ; Marinakiza *et al.*, 2001), ainsi que le ratio chloroforme/méthanol/eau (2 :2 :1).

De plus, la récupération de la phase chloroformique a été réalisée sans précipitation (débit lent) et après séparation complète des deux phases, afin de ne pas modifier l'équilibre du système.

1.4. Evaluation de la teneur en protéines de la graine.

L'analyse de la teneur en azote par microtitration Kjeldahl (Chapitre *Etat de l'art* 1.2.5) a permis d'évaluer la teneur en protéines à $31,4 \pm 0,2$ g / 100 g de graines soit 33,6 g / 100 g de MS (représentatif de la moyenne de 12 échantillons). Le facteur de conversion protéique utilisé est de 6,25 (Rozan, 1997) quoique discuté par certains auteurs. Ce résultat est nettement supérieur à celui de Domínguez *et al.*, 1994 qui évaluent la teneur en protéines de la graine à 23,4% mais se rapprochent des résultats de Bell, 1984 et 2001 qui estime cette teneur à des valeurs allant de 25 à 30%. Ce résultat peut s'expliquer par la variabilité de la composition de la graine, liée à la variété cultivée, à son environnement, aux conditions agro-climatiques, ainsi qu'à ses prédispositions génétiques, voire au facteur de conversion utilisé qui surévaluerait légèrement la quantité de protéine présentes.

1.5. Evaluation de la teneur en cendres de la graine.

La teneur en cendres de la graine mesurée après minéralisation à 560°C s'élève à $3,9 \pm 0,2$ g / 100 g de graines soit $4,16$ g / 100 g de MS (représentatif de la moyenne 12 échantillons). Ce résultat correspondant à la fraction en sels minéraux et en composants inorganiques de la graine est comparable aux données de la littérature : $3,8$ g / 100 g de graines (Domínguez *et al.*, 1994) ou $3-4$ g / 100 g de graines Bell 1984, 2001.

1.6. Evaluation de la teneur en minéraux de la graine.

L'analyse par spectrométrie de flamme des minéraux a permis de déterminer la composition suivante :

- concentration en potassium [K] : 812 ± 40 mg / 100 g de graines,
- concentration en calcium [Ca] : 477 ± 10 mg / 100 g de graines,
- concentration en magnésium [Mg] : 210 ± 7 mg / 100 g de graines,
- concentration en sodium [Na] : 48 ± 6 mg / 100 g de graines.

Il est difficile de comparer ces résultats aux données de la littérature car ces dosages sont généralement réalisés sur le tourteau et non sur la graine entière. Toutefois les travaux de Mac Kevith, 2005 permettent une comparaison directe des résultats obtenus avec des valeurs de la littérature. Si les valeurs pour le K et le Ca correspondent totalement à celles de ces travaux respectivement ($0,87$ et $0,51$ mg / 100 g de graines) les valeurs pour le Mg et le Na semblent inversées respectivement ($0,005$ et $0,25$ mg / 100 g de graines).

1.7. Evaluation de la teneur en Phosphore de la graine.

La teneur en phosphore de la graine a été réalisée par détermination spectrophotométrique à 660 nm contre une gamme étalon.

Ces résultats 570 ± 20 mg / 100 g de graines sont inférieurs à ceux obtenus par Mc Kevith, 2005 (800 mg / 100g de graines). Cette quantité de Phosphore peut paraître énorme au regard des quantités généralement présentes dans l'huile brute (300 ppm maximum) mais provient de la présence d'acide phytique dans la graine (acide myo-inositolhétérophosphorique). La différence entre nos valeurs et les valeurs expérimentales pourraient s'expliquer par une variation de la composition en phosphore inhérente à la graine.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

1.8. Conclusions

Les valeurs déterminées pour la composition de la graine mise en œuvre sont globalement en adéquation avec les valeurs moyennes relevées lors de la revue bibliographique. Les variations peuvent s’expliquer par la variabilité de composition de la graine étudiée. Le tableau suivant en permet la récapitulation.

Tableau D-2 : Tableau récapitulatif de la composition physicochimique de la graine de colza utilisée, en comparaison avec les données bibliographiques.

	<i>composition de la graine (g/100 g graines)</i>	<i>composition de la graine (g/100 g MS)</i>	<i>Domínguez et al., 1994° et Mc Kevith,2005 (g/100 g graines)</i>	<i>Bell, 84; 2001 (g/100 g graines)</i>
<i>huile</i>	41,7 (0,1)	44,7	41,6°	38-42
<i>protéines</i>	31,4 (0,2)	33,6	26,2°	25-30
<i>cendres</i>	3,9 (0,2)	4,2	3,8°	3-4
<i>humidité</i>	6,6 (0,3)	-	5°	6-7
<i>TDF*</i>	21 (1)	22	23,4°	20-28
<i>IDF**</i>	15 (1)	16	nd	nd
<i>K</i>	0,81 (0,04)	0,87	0,8°°	nd
<i>Ca</i>	0,48 (0,01)	0,51	0,4°°	nd
<i>Na</i>	0,21 (0,01)	0,23	0,005°°	nd
<i>Mg</i>	0,05(0,01)	0,05	0,25°°	nd
<i>P</i>	0,57 (0,02)	0,61	0,8°°	nd

* TDF : Total dietary fiber : fibres alimentaires totales ; ** IDF : Insoluble dietary fiber : fibres alimentaires insolubles.

Les résultats sont issus du calcul de la moyenne et de l’écart-type (valeur entre parenthèses) sur 12 échantillons pour les cendres, le taux d’humidité de la graine et le calcul du taux de protéines, et de 6 échantillons pour la teneur en calcium (Ca), potassium (K), sodium (Na), magnésium (Mg) et phosphore (P).

1.9. Détermination des indices de qualité des lipides et de leur composition en acides gras.

L’analyse de la qualité des lipides (mesure des indices classiques, cf paragraphe Matériels et Méthodes B.2) a été réalisée à partir des lipides totaux de la graine extraits par la méthode de Bligh & Dyer (1959). L’ensemble des résultats est présenté dans les tableaux et figures qui suivent.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

1.9.1. Propriétés des lipides extraits et indices d'altération.

Tableau D-3 : Caractéristiques chimiques de l'huile obtenue après la méthode de Bligh & Dyer, 1959 comparées à la norme codex stan 210 (FAO) et les résultats pour une huile de colza raffinée.

	indice d'iode	indice d'acide (ml KOH IN / 100g d'huile)	indice de saponification (mg KOH / g d'huile)	couleur (LAB)			contenu en matières solides à 20°C (RMN)	point de fusion (°C) Par DSC		
				L	A	B		pic 1	pic 2	pic 3
Lipides totaux colza (Bligh & Dyer, 1959)	110 (1)	7,1 (0,1)	150 (10)	28,3 (0,4)	0,6 (0,6)	10,8 (1,0)	0,26 (0,03)	-38	-24,8	-19
valeurs de la littérature	105 - 126*	4 max*	182-193*	29,9 (0,2)**	-0,14 (0,02)**	-0,7 (0,1)**	0,27 (0,03)**	nd	nd	nd

*d'après la norme codex stan 210 de la FAO amendée 2003 et 2005

**référence L*a*b* et contenu en matière solides : huile de canola raffinée (Winny, Allemagne)

Avec RMN : Résonance magnétique nucléaire du proton, DSC : Analyse calorimétrique différentielle, nd : non déterminé.

Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions ainsi que l'écart-type correspondant entre parenthèses.

Le résultat obtenu pour l'indice d'iode, 110 ± 1 , permet d'affirmer que la composition en acides gras polyinsaturés coïncide avec celle déterminée par la norme codex stan 210 de la FAO (105-126). Toutefois, les indices d'acide et de saponification ($7,1 \pm 0,1$ et 150 ± 10 respectivement) se trouvent hors norme (respectivement 4 et 182-193). Ceci peut s'expliquer par le fait que les lipides obtenus ne sont ni raffinés ni purifiés, comprennent donc encore des composants non triglycéridiques et ont pu subir une légère dégradation. La présence de ces composants implique une sur-évaluation de l'indice d'acide par le biais de la présence d'AGL non éliminés par rapport à une huile raffinée (huile du codex stan 210) et une sous-évaluation de l'indice de saponification par le biais de la sur-évaluation des composants triglycéridiques lors du dosage.

On peut noter une différence de couleur L*a*b* entre les lipides totaux obtenus par la méthode de Bligh & Dyer et la référence huile industrielle raffinée (Winny, Allemagne), notamment au niveau de la Luminance (28,3 contre 29,9) et la composante b de la couleur (10,8 contre -0,7) qui tire donc sur le jaune. Ceci provient du fait que les lipides obtenus ne sont pas raffinés. Il existe donc encore des composés colorants (pigments) dans l'huile, même si l'extraction par la méthode de Bligh & Dyer permet en partie une décoloration partielle par

Caractérisation des constituants de la graine de colza

la rétention de certains pigments dans la phase aqueuse méthanolique (Shahidi et Wanasundra, 2002).

La photographie qui suit, réalisée lors de l'une des extractions, montre la rétention de pigments dans la phase supérieure méthanolique (Figure D 1).



Figure D-1 : Photographie représentant la phase de décantation lors de la méthode de Bligh & Dyer. La phase supérieure colorée correspond à la phase aqueuse méthanolique, alors que la phase inférieure correspond à la phase chloroformique contenant les lipides.

Les résultats de Résonance Magnétique Nucléaire Basse Résolution du proton sur les lipides montrent un contenu en matière solide mesurés à 5 et 20°C sont équivalents à celui de l'huile industrielle. Ces compositions semblent donc assez proches.

Les résultats de DSC sur les lipides totaux de la graine obtenus par la méthode de Bligh & Dyer montrent un profil avec trois points de fusion discernables, dont un pic et deux épaulements (Figure D 2). Ceci suggère la présence de trois classes de lipides de composition spécifique.

- Le premier épaulement correspondrait à la fraction triacylglycérols avec un bas point de fusion (-39°C) : triacylglycérols substitués par des chaînes d'acides gras fortement insaturées.
- Le pic (-25°C) serait celui de triacylglycérols dont les chaînes latérales sont des acides gras légèrement moins insaturées
- Et enfin, le second épaulement correspondrait à la fraction triacylglycérols avec le point de fusion le plus élevé (-19°C), les chaînes latérales seraient donc les moins insaturées.

On peut noter que ces points de fusion ont tous des températures inférieures à 0°C, ce qui s'explique par le fait que l'huile de colza ne présente qu'une très faible proportion d'acides gras saturés, moins de 7%, et quasiment aucun triacylglycérol tri-insaturé. De plus une

Caractérisation des constituants de la graine de colza

analyse de la régidistribution des AG sur les différentes fractions lipidiques mises en évidence aurait permis la confirmation de ces résultats.

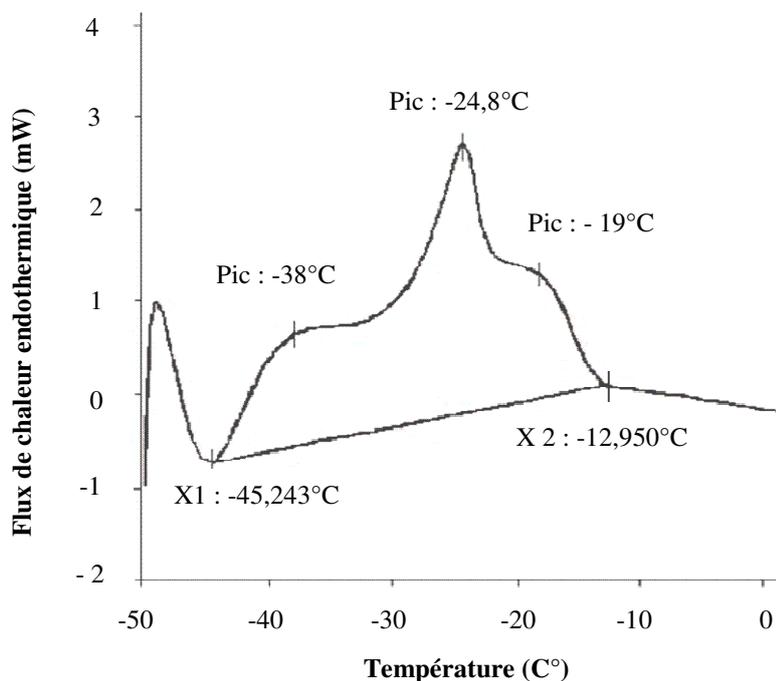


Figure D-2 : Profil en DSC des lipides totaux de la graine de colza obtenus par la méthode de Bligh & Dyer.

1.9.2. Détermination des composants polaires et apolaires des lipides par Iatroscan®.

L'analyse des lipides de la graine obtenus par la méthode de Bligh & Dyer permet de quantifier et d'identifier l'ensemble des classes lipidiques présentes par séparation sélective en fonction de leur solubilité et leur affinité pour les solvants utilisés.

Le brûlage total des *chromarods* après une migration unique dans un solvant constitué d'hexane, d'éther diéthylique et d'acide formique (80/20/0,2) permet d'identifier la fraction de lipides apolaires par rapport à la fraction polaire (Figure D 3). Sur cette figure on peut identifier deux principales classes de lipides :

- la fraction apolaire correspondant aux triacylglycérols : Pic 1 représentant 85 % du pourcentage d'aire révélé pour une moyenne de trois essais
- la fraction polaire des lipides n'ayant pas ou peu migré dans ce solvant soit 15%.

On peut toutefois noter un léger pic au niveau du front de migration qui correspondrait aux esters de stérols. Et de légers pics issus de la dégradation de l'huile (AG, MG et DG).

Caractérisation des constituants de la graine de colza

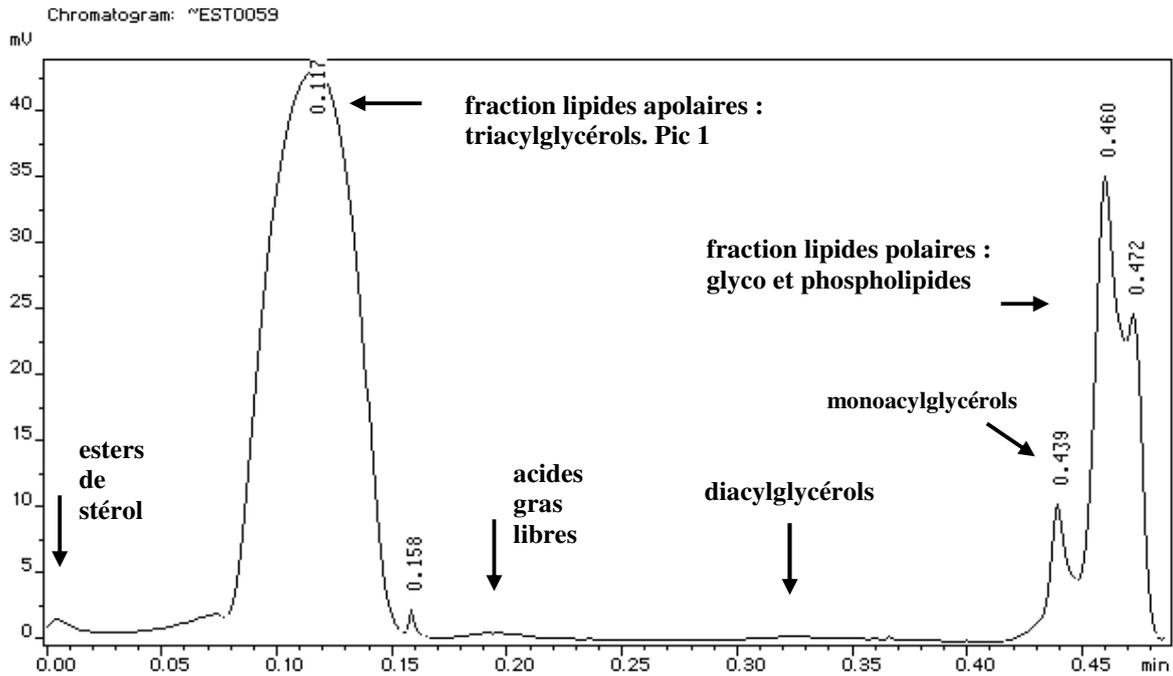


Figure D-3 : Chromatogramme des lipides totaux de graine de colza obtenus par la méthode de Bligh & Dyer. Scan total après migration de 27 minutes dans le solvant (hexane /éther diéthylique/ acide formique : 80/20/0,2).

Le second chromatogramme (Figure D 4) représente le développement des lipides polaires lors d'une migration dans un second solvant (chloroforme/méthanol/eau/ammoniac : 65/35/5/0,28). L'analyse du chromatogramme par identification est la suivante :

Après une série de pics de très faible intensité, on observe des pics avec des temps de rétention intermédiaires (3 pics : 0,244, 0,293 et 0,339 min) qui correspondraient à la fraction phospholipides respectivement phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine, phosphatidylcholine. Le pic de forte intensité à 0,400 min représenterait le contenu en lysophosphatidylcholine, et finalement le pic n'ayant pas migré pourrait être du au phosphatidylinositol ainsi qu'aux pigments présents dans les lipides.

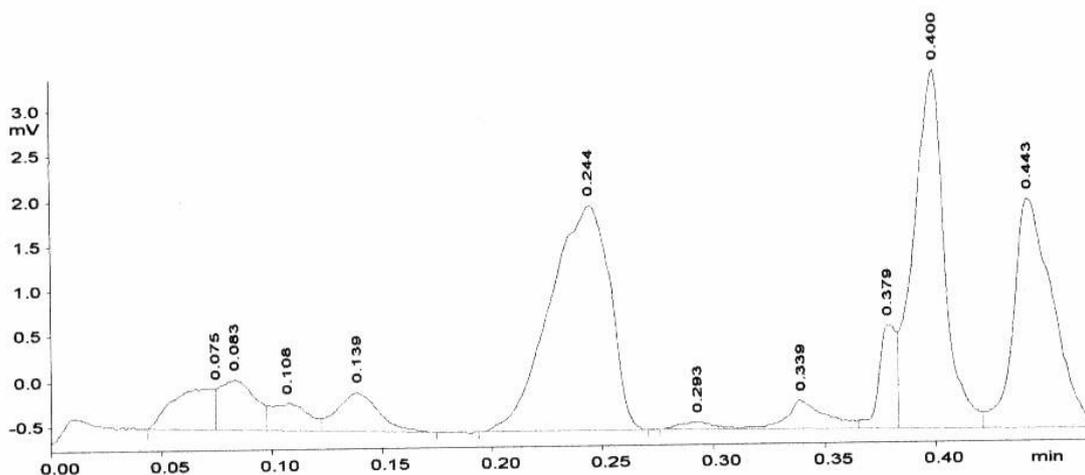


Figure D-4 : Chromatogramme des lipides totaux de graine de colza obtenus par la méthode de Bligh & Dyer. Scan total après migration de 35 minutes dans le solvant (chloroforme/méthanol/eau/ammoniac : 65/35/5/0,28) après Scan partiel (PPS10) réalisé lors de la première migration dans le solvant (hexane /diéthyl éther/ acide formique : 80/20/0,2)

1.9.3. Détermination de la composition en acides gras des lipides par chromatographie en phase gazeuse.

Le Tableau D 4 reprend résultats de la composition en acides gras pour des lipides obtenus par différentes méthodes d'extraction.

D'après ces résultats, on peut observer de légères différences du profil en acides gras des lipides en fonction de leurs méthodes d'extraction, mais la composition reste toujours dans le cadre des normes éditées par la FAO (colonne de droite). Ces différences sont essentiellement liées à la teneur en C16:0 en C18:1 et C18:2 et 3, composants essentiels de ces lipides alors que les pourcentages des composants minoritaires semblent stables.

Elles pourraient avoir plusieurs origines :

1/ soit l'oxydation des acides gras polyinsaturés conduisant à un enrichissement en acides gras au nombre d'insaturation inférieur (cas de l'huile libre et des lipides extraits par l'éthanol qui sont enrichis en C16 aux dépends des C18:1 et/ou 3, cas des lipides extraits par la méthode de Bligh & Dyer, au chloroforme ou par Soxhlet qui sont enrichis en C18:1 aux dépends du C 18:2).

2/ Soit à une affinité ou une solubilité préférentielle des solvants utilisés pour des classes de composants particuliers (polaires ou apolaires). La polarité spécifique de ces composants et leur composition propre impliqueraient des biais dans la composition en acide gras.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

Pour valider l'une ou l'autre de ces hypothèses, des expériences en chromatographie sur couche mince, suivies d'une chromatographie en phase gazeuse, ont été réalisées sur les fractions polaires et apolaires des lipides après extraction par la méthode de Bligh & Dyer.

Tableau D-4 : Comparaison du profil en acides gras (% aire) obtenu par CPG de lipides de colza extraits par différentes méthodes et des résultats issus de la littérature.

acides gras	colza expérimental huile libre, extraction enzymatique	lipides totaux graine (Bligh & Dyer)	lipides obtenus par lavage au chloroforme après Bligh & Dyer	huile extraite par Soxhlet (hexane)	lipides obtenus par lavage à l'éthanol après Bligh & Dyer	huile de colza* industrielle
<i>C16:0</i>	6,2 (0,1)	4,6 (0,2)	4,7 (0,1)	4,4 (0,1)	6,7 (0,1)	2,5-7,0
<i>C18:0</i>	1,7 (0,1)	1,6 (0,1)	1,5 (0,1)	1,5 (0,1)	1,3 (0,1)	0,8-3,0
<i>C20:0</i>	1,2 (0,1)	1,22 (0,1)	1,2 (0,1)	1,2 (0,1)	0,8 (0,1)	0,2-1,2
<i>C22:0</i>	nd	nd	nd	0,4 (0,1)	nd	nd-0,6
total saturés	9,1	7,5	7,4	7,4	8,8	
<i>C16:1</i>	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	0,3 (0,1)	nd	0,4 (0,1)	nd-0,6
<i>C18:1</i>	56,7 (0,1)	60,8 (0,3)	60,2 (0,1)	61,1 (0,1)	57,4 (0,2)	51,0-70,0
<i>C20:1</i>	0,3 (0,1)	0,3 (0,1)	0,3 (0,1)	0,3 (0,1)	nd	0,1-4,3
<i>C22:1</i>	nd	0,2 (0,1)	nd	0,2 (0,1)	nd	nd-2,0
total monoinsaturés	57,5	61,2	60,8	61,6	57,8	
<i>C18:2n-6</i>	22,7 (0,1)	20,1 (0,1)	20,5 (0,1)	20,0 (0,1)	23,4 (0,1)	15,0-30,0
<i>C18:3n-3</i>	9,3 (0,1)	9,4 (0,2)	9,6 (0,3)	9,6 (0,1)	8,4 (0,1)	5,0-14,0
total polyinsaturés	32,05	29,5	30,1	29,6	31,8	

*d'après la norme codex stan 210 de la FAO amendée 2003 et 2005 ; nd : non déterminé.

Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions et leur écart-type associé entre parenthèses.

1.9.4. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM).

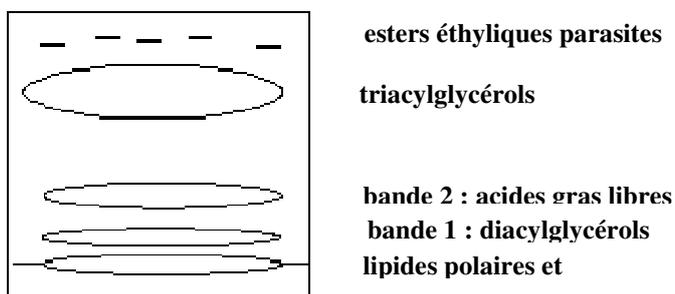


Figure D-5 : Représentation schématique des bandes obtenues après une chromatographie sur couche mince de silice (35 minutes de migration, 20°C, solvant hexane/diéthyl-éther/acide formique (80/20/0,2)) des lipides totaux de colza obtenus par la méthode de Bligh & Dyer (1959).

Les résultats de la migration en chromatographie sur couche mince font apparaître quatre bandes distinctes et une bande sous forme de traces au niveau du front de migration (Figure D 5). Le solvant de migration utilisé (solvant apolaire : hexane/diéthyl-éther/acide formique (80 / 20 / 0,2)) permet de faire migrer préférentiellement les lipides solubles et / ou ayant une forte affinité pour celui-ci. Ainsi, au niveau du front de migration et de haut en bas, on retrouve des esters éthyliques parasites (en très faible quantité) liés à l'utilisation d'hexane stabilisé à l'éthanol (2%), suivis d'une bande conséquente de lipides apolaires : les triacylglycérols (identifiés par un standard). Au niveau de la ligne de dépôt, et de bas en haut, on retrouve trois bandes de faible ampleur. La première bande correspond à la fraction lipidique n'ayant absolument pas migré et correspond aux lipides très polaires : les phospholipides (identification par standard) et glycolipides, suivent alors deux bandes (bande 1 et bande 2) qui correspondent à des lipides de polarité intermédiaire respectivement aux diacylglycérols et aux acides gras libres issus de la légère dégradation des lipides. Après prélèvement des différentes bandes, désorption des lipides de la silice et estérification par la méthode de Lepage et Roy (1986), les différentes classes de lipides ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse. L'emploi de cette méthode a été justifié par les faibles quantités de lipides adsorbés sur la silice, la méthode classique d'estérification au $\text{BF}_3/\text{méthanol}$ ne permettant pas d'obtenir des résultats satisfaisants.

Caractérisation des constituants de la graine de colza

1.9.5. Analyse des lipides par chromatographie en phase gazeuse après chromatographie sur couche mince.

Les résultats de la CPG des différentes bandes obtenues par chromatographie sur couche mince montrent des profils d'acides gras qui varient en fonction de la polarité des classes lipidiques (Tableau D 5). Ainsi, la fraction polaire des lipides exprime les plus fortes concentrations en C16:0 (7,7%), C18:2 (24,8%) et C20:0 (2,3%) alors qu'elle contient les plus faibles concentrations en C18:0 (1,6%), C18:1 (48,4%) et C18:3 (7,1%). A l'inverse, la fraction apolaire présente les plus fortes concentrations en C 16:0 (4,6 %), C18:2 (19,5%) et les plus fortes en C18:1 (60,7%) et C18:3 (10,0%). Les bandes 1 et 2 présentent des profils intermédiaires ; notons tout de même qu'elles se rapprochent respectivement de la composition de la bande de lipides apolaires et polaires. Aucune tendance nette ne peut donc se dégager pour la composition en acides gras en fonction de la polarité pour ces classes de lipides de polarités intermédiaires.

Tableau D-5 : Tableau représentatif de la composition en acides gras (% aire) des différentes classes de lipides obtenue par chromatographie sur couche mince (35 minutes de migration, 20°C, solvant hexane/diéthyl-éther/acide formique (80:20:0,2) des lipides de graine de colza extraits par la méthode de Bligh & Dyer (1959) et celle de Lepage et Roy (1986).

	<i>fraction lipides polaires : PL (%)</i>	<i>bande intermédiaire1 : DG (%)</i>	<i>bande intermédiaire2 : AGL (%)</i>	<i>fraction lipides apolaires TG (%)</i>
<i>C14:0</i>	traces	0,6 (0,1)	traces	traces
<i>C16:0</i>	7,7 (0,3)	5,2 (0,1)	7,2 (0,1)	4,6 (0,1)
<i>C18:0</i>	1,6 (0,1)	1,9 (0,1)	2,4 (0,1)	1,7 (0,1)
<i>C18:1</i>	58,4 (1,2)	58,1 (0,9)	55,3 (0,2)	60,7 (1,4)
<i>C18:2</i>	24,8 (0,7)	21,1 (0,3)	21,8 (0,1)	19,5 (0,4)
<i>C18:3</i>	7,1 (0,2)	8,3 (0,5)	8,6 (0,1)	10,0 (0,2)
<i>C20:0</i>	2,3 (0,2)	1,0 (0,1)	1,0 (0,1)	1,31(0,1)
<i>C20:1</i>	traces	0,9 (0,1)	traces	traces

avec PL : Phospholipides, MG : Monoacylglycérols, DG : Diacylglycérols, AGL : acides gras libres. moyenne de trois répétition et écart-type associé entre parenthèses.

En s'attardant sur la polarité des solvants utilisés dans le Tableau D4, on peut en partie expliquer les différences dans les résultats obtenus au niveau des profils CPG après extractions ou rinçages variés (chloroforme ou éthanol) des lipides de graine de colza.

Si on établit un classement décroissant de la polarité de ces solvants on obtient :

Caractérisation des constituants de la graine de colza

eau ($P > 1,1$) > méthanol ($P : 0,95$) > éthanol ($P : 0,88$) > chloroforme ($P : 0,43$) > hexane ($P : 0,0$) avec P pour polarité (chromatoguide Interchrom : caractéristique des solvants chimiques, 2001).

Pour justifier ou infirmer les hypothèses précédemment citées (oxydation des lipides ou affinité et solubilité dans le solvant), on peut noter que le profil CPG de l'huile obtenue par extraction à l'hexane ($P : 0,0$) est proche du profil des composants lipidiques apolaires extraits par la méthode de Bligh & Dyer (TG en CCM). Ceci est en accord avec le fait que chaque solvant extrait préférentiellement les composés de polarité proche du fait d'une meilleure affinité.

Les lipides extraits par la méthode de Bligh & Dyer ont aussi un profil proche en composants apolaires. Ceci peut s'expliquer par les faits suivants :

- le profil se rapproche de la classe majoritaire présente dans ces lipides en l'occurrence la fraction apolaire : la bande la plus conséquente en CCM.
- la présence de méthanol ($P : 0,95$) et d'eau ($P > 1,1$) lors de l'extraction par la méthode de Bligh & Dyer fait qu'une partie des composés les plus polaires se retrouvent dans cette phase non recueillie lors de l'analyse.

Les lipides résiduels désorbés par lavage au chloroforme après extraction par la méthode de Bligh & Dyer ont un profil proche de celui des lipides apolaires obtenus en CCM.

Ceci peut se comprendre par le fait que le chloroforme de polarité intermédiaire ($P : 0,43$) doit avoir une affinité réduite pour les composés lipidiques les plus polaires et ne désorbe donc qu'une petite fraction de ceux-ci. De plus, la solubilité de ces lipides dans ce solvant peut être discutée. Ceci est appuyé par des faits expérimentaux qui impliquent la dissolution des standards polaires dans un mélange chloroforme/méthanol 2 : 1 (v/v), mélange de solvants dans lequel ces composés sont solubles.

Les lipides extraits par rinçage à l'éthanol ($P : 0,88$) après une extraction par la méthode de Bligh & Dyer ont une composition proche de celle obtenue pour la bande de lipides polaires n'ayant pas migré et pour la bande de lipides polaires 2. Ceci confirme le fait que ce sont les propriétés du solvant d'extraction qui gouvernent l'extraction des lipides et la composition de la fraction extraite. Ce solvant de forte polarité extrait donc comme attendu préférentiellement des lipides polaires.

Pour finir, l'huile libre présente un profil proche de la composition de la fraction polaire. Du fait de sa provenance (émulsion), il semble plus que probable qu'il existe au sein de cette

Caractérisation des constituants de la graine de colza

fraction une grande partie de lipides ayant une affinité pour les solvants polaires (présence de phospholipides de nature amphiphile).

1.10. Conclusions.

Il apparaît clairement à la vue de ces résultats que le lot de graines étudié a des caractéristiques de composition conformes à la littérature disponible sur la graine de colza.

L'extraction des lipides totaux par différentes méthodes montre des compositions variées imputables d'une part à une légère oxydation et au non-raffinage des lipides, mais surtout à une affinité spécifique des constituants pour les solvants et à leur solubilité dans ceux-ci.

2. Chapitre 2 : Déstructuration enzymatique du tissu végétal.

2.1. Contexte actuel et choix des enzymes.

L'extraction de l'huile est une opération longue et ardue. D'après Kelley (2005), le but de ces extractions étant d'extraire l'huile "enfermée" dans des matrices complexes de plante, cette opération est particulièrement difficile du fait de l'intégrité structurale de la paroi cellulaire et des opportunités limitées pour des molécules relativement larges (les lipides) de sortir d'une telle matrice. Pour mieux comprendre le rôle potentiel des enzymes, il est essentiel de connaître la structure de la graine étudiée. Comme on peut le voir sur la photographie ci-dessous issue d'une observation en microscopie électronique en transmission de la graine de colza broyée, les cellules possèdent une structure très compartimentée (Figure D 6).

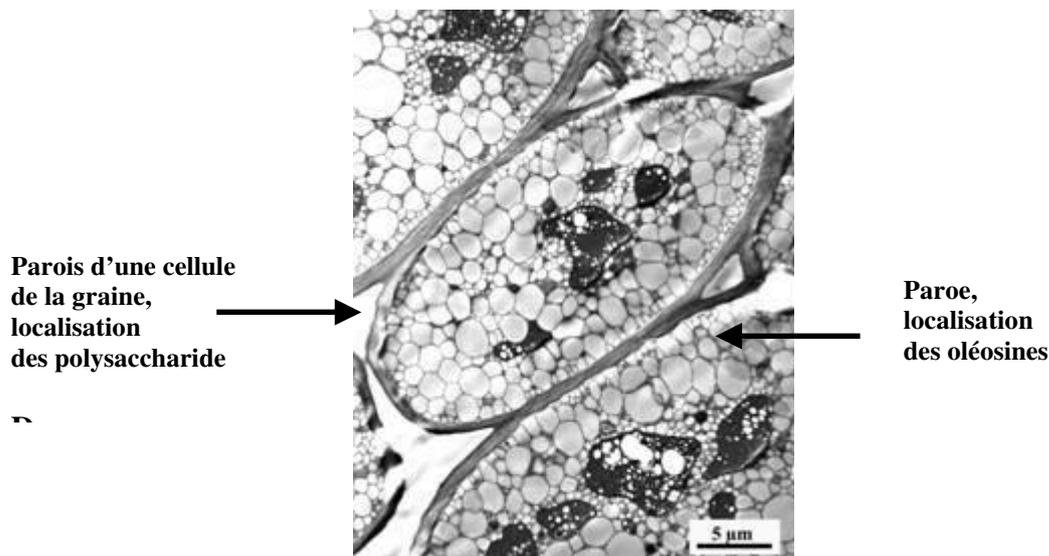


Figure D-6 : Microstructure des cellules de la graine de colza broyée avant hydrolyse enzymatique par microscopie électronique à transmission.

Le point essentiel est la présence d'organelles cellulaires, appelés corps protéiques ou lipidiques, qui contiennent respectivement l'essentiel des protéines (60-70%) et des lipides. Outre ce matériel cytoplasmique, les parois qui entourent la cellule sont composées de cellulose, d'hémicellulose, de lignine et de pectine.

Dans le procédé classique d'extraction à l'aide de solvants, la graine est aplatie, ce qui cause la rupture de la paroi cellulaire. Ceci permet l'exposition de l'huile localisée à l'intérieur des cellules et facilite la percolation par les solvants, l'huile peut donc diffuser plus facilement. Lors de l'étude, ce traitement mécanique n'a pas lieu et comme le montre cette photographie certaines cellules demeurent intactes après broyage.

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

De plus, lors des extractions aqueuses, on passe d'un système huile/solvant (hexane) à un système huile/non solvant (eau). Ceci ne facilite pas la diffusion de l'huile hors des cellules (Rosenthal, 1996).

Afin d'extraire l'huile contenue dans les corps lipidiques, une déstructuration de la compartimentation est nécessaire. Le choix des enzymes a donc été déterminé par la structure intrinsèque de la graine de colza et sa composition.

La présence de protéines, les oléosines (Li *et al.*, 1992 et 2002 ; Tzen et Huang, 1992 ; Tzen *et al.*, 1993 ; Huang, 1996 ; Leprince *et al.*, 1998), participant au maintien de la structure des corps lipidiques de la graine et leur susceptibilité à l'hydrolyse, justifie l'utilisation de protéases. Bair et Snyder, 1980 et Tzen et Huang, (1992) ont isolé respectivement des corps lipidiques de soja et de maïs matures et ont réalisé une hydrolyse à l'aide d'une protéase, la trypsine. Ils ont mis en évidence l'hydrolyse de la membrane des corps lipidiques, liée à l'hydrolyse des oléosines, ainsi que la coalescence de certains de ceux-ci. Ceci permet de conclure quant à la susceptibilité de l'huile à être extraite plus facilement en solvant aqueux (ou organique) après action protéolytique.

D'autre part, l'existence de polysaccharides participant à la structure des parois cellulaires a suggéré l'utilisation de polysaccharides hydrolases.

L'utilisation de ces enzymes a déjà fait ses preuves, lors de nombreux travaux d'extraction aqueuse, où il a été montré que l'utilisation concomitante de ces deux types d'enzymes permettait l'obtention des meilleurs rendements en lipides.

2.1.1. Le choix des protéases.

De façon théorique, on peut dire qu'il existe deux grands types de protéases: les endo et exoprotéases. Alors que les endopeptidases coupent les liaisons peptidiques entre deux résidus acides aminés adjacents dans la séquence de la structure primaire d'une protéine, impliquant la formation de deux peptides, les exopeptidases fonctionnent différemment. Elles hydrolysent les protéines en partant de l'extrémité N-(aminopeptidases) ou C (carboxypeptidases) terminales des protéines libérant ainsi des acides aminés libres.

D'après l'analyse bibliographique réalisée, l'utilisation de protéases est une des solutions envisagée dans de nombreux travaux lorsque l'extraction aqueuse de l'huile conduit à de trop faibles rendements. Outre les caractéristiques des extractions aqueuses (remplacement des solvants toxiques et inflammables (Johnson et Lusas, 1983), obtention d'une huile de haute qualité et d'un tourteau détoxifié (Lanzani *et al.*, 1991 ; Ohlson, 1992), l'utilisation de ces enzymes présente l'avantage de rendre la fraction protéique du culot plus disponible en vue

 Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

de l'alimentation animale en permettant une augmentation de la fraction azotée assimilable. De plus, certaines études approfondies ont permis de mettre en évidence la formation de peptides présentant des activités biologiques valorisables dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques ou agricoles.

De façon générale, les facteurs affectant l'hydrolyse enzymatique sont très nombreux. Ils incluent la nature du substrat, la spécificité enzymatique, l'étendue de la dénaturation des protéines liée au process, le ratio enzyme/substrat, le ratio graine/eau, le pH et la force ionique, la température, la vitesse d'agitation, l'absence ou la présence de substance inhibitrices, et le temps d'extraction (Panyam et Kilara, 1996, Rosenthal, 1996, Sineiro *et al.*, 1998).

Afin de couvrir le plus large spectre d'activité enzymatique protéolytique, et sachant que chaque enzyme à sa spécificité, quatre protéases ont été testées :

- **L'alcalase[®] 2,4L** (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danemark), endopeptidase à sérine produite à partir d'une souche sélectionnée de *Bacillus licheniformis* ; activité standard : 2,4 AU/g.
- **La Neutrase[®] 0,8L** (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danemark), endopeptidase à Zinc (métalloprotéase) produite à partir d'une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* ; activité standard est de 0,8 AU/g.
- **La Flavourzyme[®] 1 L** (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danemark) enzyme fongique produite à partir d'une souche d'*Aspergillus oryzae*. douée à la fois d'activité endo et exo-protéasique ; activité standard : 1 LAPU / g d'enzyme (Unité Leucine aminopeptidase).
- **La Protamex[®]** (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danemark), endoprotéase issue d'une souche de *Bacillus subtilis* ; activité standard : 1,5 AU/g.

Des informations plus détaillées sont présentées dans le paragraphe Matériels et Méthodes.

2.1.2. Le choix des polysaccharides hydrolases.

La présence de différents polysaccharides au niveau des parois cellulaires primaire et secondaire de la graine de colza (cellulose : 22%, hémicellulose : 29%, pectine : 39%) a justifié l'utilisation de cellulases, d'hémicellulases et de pectinases. Comme les protéases, leur utilisation dans de nombreux travaux avec des substrats variés a permis de démontrer que sous certaines conditions le rendement en huile lors des extractions aqueuse était amélioré

(Dominguez *et al.*, 1995 ; Sineiro *et al.*, 1998). Dès 1969, l'emploi de ces enzymes afin de déstructurer les parois végétales a été envisagé. C'est ce que montre l'illustration ci-dessous issue des travaux de Toyama *et al.*, 1969 qui travaillaient sur le soja. Toutefois, aucune application industrielle sur un substrat de type « graine » n'est aujourd'hui exploitée.

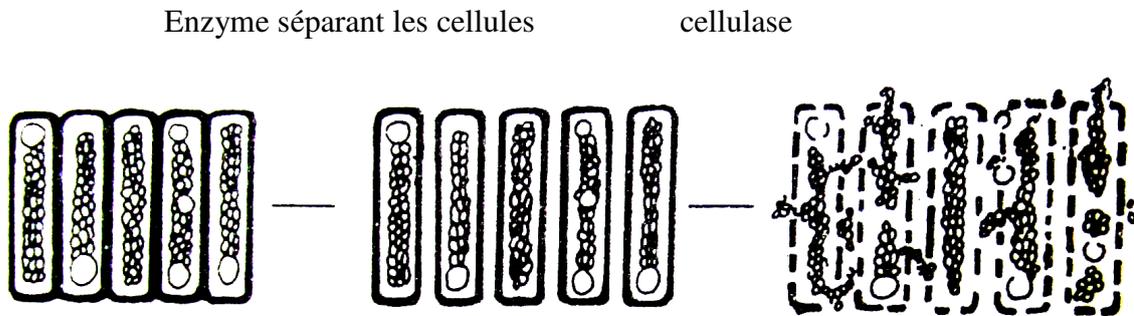


Figure D-7 : Dégradation enzymatique des parois cellulaires de soja, d'après Toyama, 1969.

Etant donné la grande diversité des polysaccharides constituant les parois des cellules végétales de la graine et la complexité de leur association, le paragraphe suivant fait état de l'ensemble des composants polysaccharidiques et des enzymes utilisées pour leur dégradation.

✓ Cellulose et cellulases

La cellulose est un homopolymère de glucose dont les unités sont liées en β 1-4 avec une longueur de chaîne d'environ 2000 à 20000 unités glucose. Les chaînes de cellulose (environ 36) adoptent une structure linéaire et s'associent pour former des microfibrilles paracristallines, par des liaisons hydrogène intra et interchaînes entre les groupements hydroxyles des résidus de glucose. Elle représente le plus abondant des polysaccharides des plantes en constituant de 15 à 30% de la paroi primaire de la plante et encore un plus grand pourcentage de la paroi cellulaire secondaire sauf dans la plupart des graines où elle est peu ou non présente dans la paroi secondaire (Carpita et McCann, 2000). Elle se trouve alors remplacée par un polysaccharide non-cellulosique, l'hémicellulose, propre à chaque espèce.

Afin d'hydrolyser de telles types de structure, les cellulases commerciales disponibles dans le domaine alimentaire sont un mélange de trois différentes enzymes (Kohlmann *et al.*, 1996).

- Les endocellulases : (Cx qui catalysent au hasard les liaisons β -glucosidiques des régions amorphes de la cellulose.)

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

- Les exocellulases (Ce qui hydrolysent la rupture de la liaison β -glucosidique terminale de l'extrémité non réductrice de la cellulose entraînant la formation d'un disaccharide nommé cellobiose.)
- Les β -glucosidases qui hydrolysent les liaisons β -glucosidiques des cellobioses.

On peut noter que la cellobiose non hydrolysée inhibe l'action des exo et endocellulases.

✓ Hémicelluloses et hémicellulases.

Les hémicelluloses sont des polysaccharides qui permettent par réticulation de renforcer la structure cellulosique de la paroi. Ils s'associent aux microfibrilles de cellulose par des liaisons hydrogène et peuvent les recouvrir ou franchir la distance entre deux microfibrilles formant ainsi un réseau. De façon générale, le xyloglucane consiste en chaînes linéaires de β -(1-4)-D-glucane avec de nombreuses unités α -D-xylose liées en positions régulières sur le glucose (position opposée au O₆ du glucose). Certaines des unités xylose sont substituées avec des L- α -arabinose ou des β -D-galactose. En fonction des espèces le galactose est parfois remplacé par du α -L-fucose. Dans le cas du colza, l'hémicellulose majoritaire est le fucogalactoxyloglucane (Carpita et McCann, 2000).

Du fait de la grande variété de structure des hémicelluloses, il existe un grand nombre d'hémicellulases correspondant au mélange d'activité des (poly)galacturonate hydrolase, mannosidase, mannanase, xylanase, lactase, β -glucanase, β -D-glucosidase, pentosanase et α -galactosidase (Food Chemical Codex, 2004).

✓ Pectines et pectinases

Les substances pectiques sont ubiquitaires dans le règne végétal et constituent le composant majeur de la lamelle moyenne, une couche mince du matériel adhésif extracellulaire qui se trouve entre les cellules adjacentes des jeunes plantes. Elles sont communément amorphes avec un degré de polymérisation de 200 à 400 (Kashyap *et al.*, 2001 ; Hoondal *et al.*, 2002).

Les enzymes qui hydrolysent ce type de substance sont connues sous le nom de pectinases et incluent les polygalacturonases, les pectines estérases et les pectine-lyases en fonction de leur mode et de leur site d'action (Alkorta *et al.*, 1998). Les pectinases sont produites à partir de sources microbiennes variées telles que les bactéries (Dosanjh et Hoondal, 1996; Kapoor *et al.*, 2000; Kashyap *et al.*, 2000), les levures (Blanco *et al.*, 1999) et des espèces fongiques (Huang et Mahoney, 1999 ; Stratilova *et al.*, 1996) ou d'actinomycètes (Beg *et al.*, 2000a, b ; Bruhlmann 1995).

Quand on parle de pectines, on distingue quatre familles de molécules (Be Miller, 1986):

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

- les pectines : chaîne principale 1,4-D-galacturonane partiellement estérifiée par des groupements méthoxy. Des unités rhamnose peuvent être insérées dans la chaîne principale uronide et régulièrement des chaînes latérales d'arabinose, de xylose, de galactose, d'arabinogalactose sont liées au rhamnose (Gummadi et Panda, 2003).
- Les acides pectiques : groupe de molécules constitué d'acides polygalacturoniques non méthoxylés,
- Les acides pectiniques : acides polygalacturoniques méthoxylés (jusqu'à 75%),
- La protopectine : la protopectine est le parent insoluble des substances pectiques. Elle est localisée dans la lamelle moyenne des parois où elle sert de glue aux cellules âgées.

Les raisons de l'insolubilité de la protopectine peuvent être les suivantes :

- sa forte masse moléculaire,
- la formation de liaisons ester entre le groupement carboxylique de la pectine et les hydroxyles des quatre constituants des parois,
- des interactions entre le groupement carboxylique de la pectine et les groupements basiques des protéines.

Pour résumer, les formulations enzymatiques avec des activités cellulasique, hémicellulasique et pectinasiques sont efficaces lorsqu'il s'agit de dégrader les parois cellulaires, de par la composition de celles-ci en polysaccharides (cellulose et hémicelluloses représentent 51% des parois du colza, Domingez *et al.*, 1994).

Lors de cette étude, un certain nombre de « cocktails » avec des activités polysaccharide hydrolases ont été testées :

- la Celluclast[®] à activité cellulasique
- la Pectinex Ultra SP à activité xylanase, pectinase et cellulase
- la Viscozyme[®] à activités pectinase, β -glucanase, cellulase, xylanase et arabinase.

Outre leur fonction essentielle dans la déstructuration des tissus végétaux, on peut noter que comme les protéases leur utilisation conduit à une amélioration de la valeur nutritionnelle du produit issu de l'hydrolyse en alimentation animale par la dégradation partielle des fibres alimentaires non assimilables.

2.2. Suivi des hydrolyses enzymatiques/

2.2.1. Suivi de la protéolyse

2.2.1.1. Suivi de la protéolyse par le degré d'hydrolyse.

Afin de suivre la protéolyse, différentes méthodes ont été utilisées.

Le contrôle de la réaction par la méthode du pH-stat a permis de déterminer le degré d'hydrolyse lors des différentes réactions d'hydrolyse testées.

Le rendement en lipides des deux phases supérieures et dans le culot, lors de ces deux réactions, a été parallèlement quantifié par la méthode de Bligh & Dyer.

De plus, une électrophorèse SDS-PAGE a permis de visualiser l'évolution de la taille des résidus protéiques en fin de réaction dans la phase hydrolysate du milieu après centrifugation.

Et enfin, la réalisation de photographies des cellules obtenues par microscopie électronique en transmission au niveau des différents stades d'hydrolyse ont permis d'évaluer l'état de dégradation des cellules.

Lors d'une protéolyse de nombreux paramètres sont à prendre en compte. Chaque substrat étant spécifique de par la nature et l'organisation des acides aminés qui le composent l'optimum d'activité dépend du substrat et d'un certain nombre de paramètres qui vont déterminer l'efficacité enzymatique.

Les premiers travaux ont consisté à évaluer l'efficacité d'hydrolyse des différentes protéases choisies sur le substrat graine de colza. En tout premier lieu, les cinétiques d'hydrolyse obtenues par la méthode du pH-stat ont été comparées. La Figure D 8 présente certaines des courbes obtenues lors des travaux préliminaires.

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

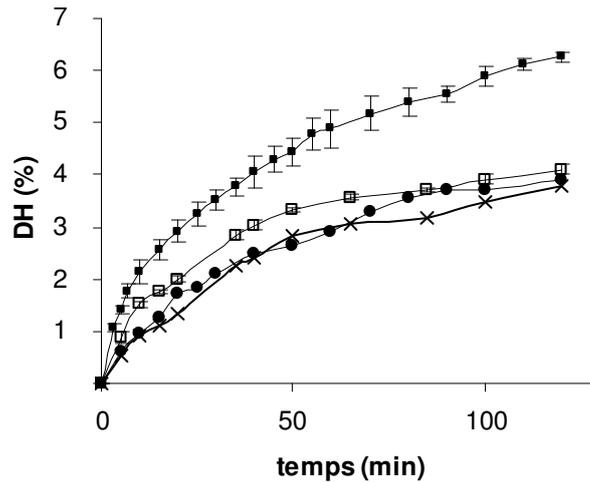


Figure D-8 : Suivi du degré d'hydrolyse de différentes enzymes en fonction du temps pour des conditions optimums de rendement en lipides dans les deux fractions supérieures en fonction de l'enzyme.

■ Alcalase® (pH 8 ; 60°C ; 2H ; E/S : 3%), □ Protamex® (pH 7,5 ; 40°C ; 2H, (E) :), ● Neutrased® (pH 7,5 ; 55°C ; 2H, E/S : 3%), x Flavourzyme® (pH 7,5 ; 50°C ; 2H ; E/S : 3%). Les courbes présentées correspondent à la moyenne de trois répétitions et leurs écarts-types associés.

Allure des courbes d'hydrolyse :

Quelle que soit la protéase utilisée, les courbes observées ont toutes un profil identique. On observe tout d'abord une action rapide de l'enzyme dans les tout premiers stades de la réaction d'hydrolyse, puis un ralentissement de cette cinétique.

En général, les cinétiques des réactions de protéolyses enzymatiques suivent soit un modèle de type Michaelis-Menten soit une cinétique de premier ordre plus ou moins complexe en fonction de la nature simple ou multiple des substrats à hydrolyser.

Les mécanismes de premier ordre sont la conséquence d'un mécanisme où l'étape de contrôle de la réaction est la première attaque sur la structure tertiaire de la protéine (Vorob'ev *et al.*, 1996). Les substrats et les produits dans le type d'équation régissant ces cinétiques sont alors exprimés en nombre de liaisons hydrolysables, soit en degré d'hydrolyse.

Il existe cependant d'autres hypothèses quant au ralentissement de cette vitesse. L'ensemble de celles-ci est récapitulé dans le paragraphe qui suit :

- Les produits de la protéolyse peuvent inhiber l'enzyme par le biais d'inactivation compétitive (O'Meara et Munro, 1985 ; Adler-Nissen, 1986 ; Marquez-Moreno et Fernandez-Cuadrado, 1993, Margot *et al.*, 1997 ; Sousa Jr *et al.*, 2004).
- D'autre part, l'enzyme n'est pas forcément stable dans les conditions utilisées : un traitement thermique prolongé peut induire une baisse de l'activité enzymatique par dénaturation de l'enzyme (*cf.* fiches techniques Novozymes A/S, Margot *et al.*, 1997).
- On peut aussi penser à des mécanismes d'autodigestion enzymatique qui conduisent à des pertes d'activité potentielles (Marquez-Moreno et Fernandez-Cuadrado, 1993).

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

- Une autre hypothèse implique la dénaturation des protéines (modification de leur structure tertiaire) lors de la réaction d'hydrolyse, ce qui, par manque d'accessibilité, entraînerait un ralentissement de la cinétique.
- Ce ralentissement peut enfin s'expliquer par la spécificité enzymatique, qui implique au cours du temps, une réduction des sites potentiellement hydrolysables au niveau des protéines présentes et des peptides néosynthétisés.

Si on ne peut conclure sur le type de cinétique et d'inactivation par manque d'investigations plus poussées liées à la difficulté d'appréhender un substrat non pur (trop de temps pour une finalité purement fondamentale), on peut toutefois grâce aux courbes de protéolyse réaliser un pré-classement quant à l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique. La comparaison des cinétiques d'hydrolyse de l'Alcalase[®] et de la Neutrase[®] à respectivement 3 et 9 % à activité enzymatique égale : 7,2 UA / 100g de protéines, montre qu'en présence de conditions expérimentales choisies pour l'activité ces enzymes, l'Alcalase[®] 2,4L est l'enzyme qui hydrolyse le plus rapidement les protéines de colza.

2.2.1.2. Suivi de la protéolyse par l'évolution de la taille des protéines dans la phase hydrolysate.

Peu d'investigations ont été réalisées sur la nature des peptides néosynthétisés lors de nos travaux. Toutefois, une électrophorèse en milieu SDS-PAGE après action de l'Alcalase[®] a permis de mettre en évidence la modification du contenu en protéines solubles dans la phase hydrolysate. C'est ce que présente la Figure D 9.

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

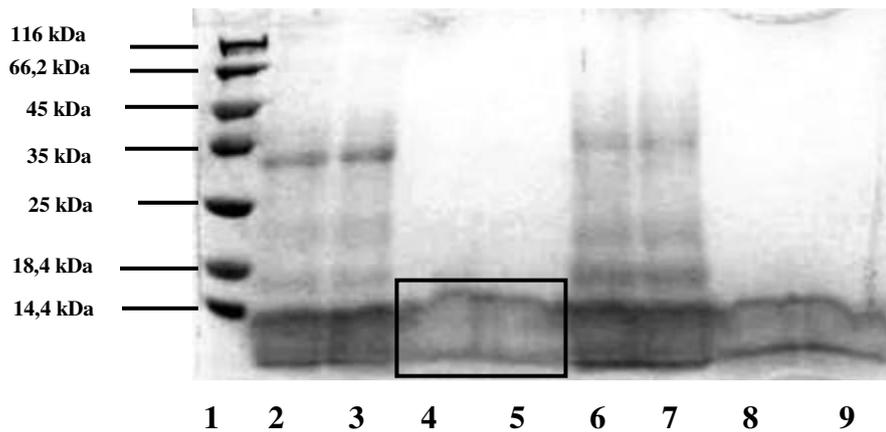


Figure D-9 : Gel SDS-PAGE des protéines de la phase hydrolysats obtenues avec ou sans hydrolyse de la graine.

La bande 1 correspond au marqueur de taille utilisé (14,4 à 116 kDa) alors que les bandes (2 et 3) et (6 et 7) correspondent aux témoins de l'hydrolyse respectivement : phase hydrolysats sans traitement enzymatique sans traitement thermique et phase hydrolysats sans traitement enzymatique et avec traitement thermique complet : 2H00 à 60°C, pH 8 et 2H00 à 55°C, pH 4,5. Les bandes (4 et 5) et (8 et 9) correspondent respectivement à la phase hydrolysats après traitement enzymatique Alcalase® (2H00, E/S : 3%, 60°C, pH 8) : 4 et 5, sous les mêmes conditions, suivi d'un traitement à la cellulase (2H00, 55°C, pH 4,5, E/S : 1%) : 8 et 9.

Après visualisation du gel d'électrophorèse, on observe distinctement des différences entre les témoins de l'hydrolyse et les bandes correspondant à l'hydrolysats après l'action des enzymes.

Alors que sur les pistes correspondant au témoin (pistes 2 et 3), on peut aisément noter plusieurs bandes correspondant à des résidus protéiques de tailles variées allant de 14 à 116 kDa, on ne visualise qu'une bande correspondant à des résidus protéiques de faible poids moléculaire sur les pistes relatives à l'action de l'Alcalase® (pistes 4 et 5).

On peut donc conclure sur l'efficacité de la protéolyse qui a permis de réduire la taille des résidus présents. En effet on observe la disparition des résidus protéiques de grande taille au profit des résidus protéiques de petite taille.

Les bandes 8 et 9 (traitement enzymatique : Alcalase® et cellulase) présentent un profil identique aux bandes 4 et 5 avec une coloration légèrement plus foncée.

2.2.2. Suivi des polysaccharides hydrolases.

Afin de pouvoir comparer assez rapidement et facilement l'action des polysaccharides hydrolases, outre la quantification des lipides dans les différentes phases, une partie des travaux a porté sur la mise au point de techniques indirectes de caractérisation de l'hydrolyse. Partant du principe que l'hydrolyse des polysaccharides libère des sucres solubles en phase aqueuse, des tests ont été réalisés sur la phase hydrolysats afin de déterminer l'évolution du

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

point cryoscopique en fonction du temps d'hydrolyse. Cette méthode a déjà fait ses preuves lors du suivi d'autres réactions enzymatiques telles que la protéolyse. Il a été démontré qu'il existait une corrélation entre l'évolution du point cryoscopique et le degré d'hydrolyse (Adler-Nissen, 1984 ; Splender, 1986 ; Linder, 1996) qui correspond à la modification de la composition du milieu lors de la réaction enzymatique. C'est ce qui est observé sur l'une des courbes obtenues par cette méthode (Figure D 10).

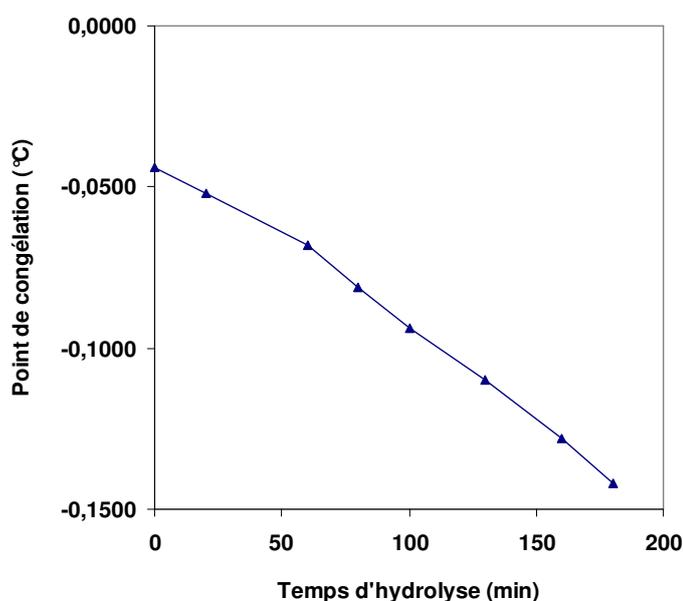


Figure D-10 : Evolution du point de congélation (phase hydrolysats après centrifugation du milieu dilué au 1/2 en fonction du temps l'hydrolyse de la Celluclast® : 35°C ; pH 4,5 ; E/S : 1% ; 2H00.

Sur cette courbe on peut observer une baisse du point cryoscopique en fonction du temps d'action de la Celluclast®. Les sucres étant connus pour leur effet cryoprotecteur, ce résultat est en accord avec les résultats attendus.

Toutefois, il a été très difficile de répéter ce type de courbe. En effet les résultats de diverses expériences n'ont pu présenter de tendance nette, les réponses semblant totalement aléatoires, ou les mesures impossibles ce qui s'explique par une grande variabilité de la réponse.

On peut supposer que lors de l'action des polysaccharides hydrolases, la rupture des liaisons glucidiques se fait de façon aléatoire. Il se peut que lors de certaines réactions l'hydrolyse ait lieu à l'une des extrémités du polysaccharide. Ceci conduit à la libération de sucres de petite taille ayant donc un impact sur le point cryoscopique de la phase hydrolysats, d'où l'allure de la courbe obtenue. Toutefois, si l'action de ces enzymes se situe en « plein cœur » du polysaccharide, les fragments libérés seront de taille supérieure et l'impact sur le point cryoscopique n'est dès lors plus visible.

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

Se basant sur une publication qui montrait une relation entre l'action de ces enzymes et le contenu en azote soluble (Wanasundara et Shahidi, 1997), la teneur en azote de la phase hydrolysats a été déterminée par la méthode Kjeldahl en fonction du temps. C'est ce que présente la Figure D 11.

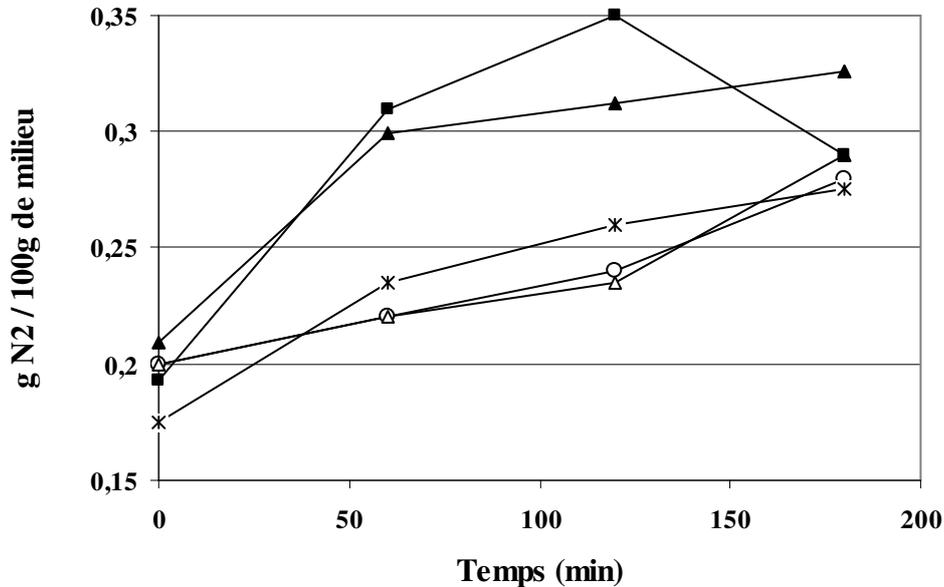


Figure D-11 : Représentation de l'évolution de la teneur en azote dans la phase hydrolysats lors de l'action des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire.

Dosage de la phase hydrolysats après centrifugation par la méthode de Kjeldahl.

-x- Pectinex® : 35°C, pH 4,5, E/S : 1% ; -Δ- Viscozyme® : 55°C, pH 4,5, E/S : 1% ; -▲- Celluclast® : 55°C, pH 4,5, E/S : 1% ; -■- Témoin 55°C ; -□- Témoin 35°C.

Cette figure représente la moyenne de trois répétitions et leurs écarts types associés

On peut observer sur ce graphique une tendance à la hausse de la teneur en azote en fonction du temps d'hydrolyse. Cependant, il n'existe pas de réelle différence entre les courbes correspondant à l'action des enzymes et leurs témoins température (expérimentation sans enzyme mais dans les mêmes conditions de température).

On peut alors penser que ce n'est pas l'action des polysaccharides hydrolases mais l'influence de la température et de l'homogénéisation qui est observée sur ce graphique.

Compte tenu de la faible discrimination apportée par les paramètres analytiques ci-dessus, et partant du fait que la quantification des lipides dans les différentes fractions était finalement le but à atteindre, c'est la quantité d'huile libérée ou de lipides extraits de l'émulsion qui ont permis de comparer l'action des différentes polysaccharides hydrolases entre-elles, sans pour autant avoir de réelle méthode analytique de contrôle de la réaction d'hydrolyse.

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

2.2.3. Suivi des différentes réactions par le pourcentage de matière grasse des différentes fractions.

La méthode de Bligh & Dyer, après centrifugation du milieu (que l'on peut considérer comme une première déstabilisation du système), donne des indications précieuses sur la répartition des lipides dans les différentes fractions, à savoir :

- ✓ phase 1 : huile libre
- ✓ phase 2 : émulsion huile dans l'eau
- ✓ phase 3 : phase protéines solubles
- ✓ phase 4 : phase protéines insolubles
- ✓ phase 5 : pellicules (Chapitre *Etat de l'art* 3.2.2).

C'est à partir de ces résultats que l'optimisation de l'hydrolyse des constituants de la graine a été réalisée, et ce, en vue de maximiser la présence de lipides dans les deux fractions supérieures, les phases 1 et 2.

Dans ce but, et après détermination du pH de centrifugation optimal (Figure D 12), l'ensemble des réactions présentées dans le tableau qui suit ont été réalisées (Tableau D 6). Nous nous sommes tout d'abord attardés sur la réalisation d'expérimentations en utilisant les protéases seules, puis les polysaccharides hydrolases seules et enfin un mélange de ces deux différents types d'enzymes avec un ordre déterminé (protéase puis polysaccharides hydrolases ou polysaccharide hydrolase puis protéases).

2.2.3.1. Détermination des paramètres d'hydrolyse et de centrifugation.

Un certain nombre de paramètres sont à régler lors d'une extraction enzymatique par voie aqueuse, tels que le ratio eau/solide, le ratio enzyme/substrat, la température du milieu, la vitesse d'agitation du milieu pendant l'hydrolyse, et les paramètres inhérents à la centrifugation post-hydrolyse.

L'ensemble de ces paramètres a été fixé après une analyse bibliographique détaillée sur le colza ainsi que suite à des tests préliminaires. Les résultats sont les suivants :

- ratio solide/liquide : fixé à ¼ d'après Rosenthal, (1996) et d'après la consistance pâteuse et non fractionnable pour des ratios inférieurs.
- le ratio Enzyme/Substrat : tests à un 2 et 3 % pour les protéases, fixé à 1% polysaccharides hydrolases (bibliographie)
- la température lors de l'hydrolyse : fixée en fonction des fiches *Novozymes A/S* pour chaque enzyme utilisée et par des connaissances internes au laboratoire.
- la vitesse de centrifugation : vitesse maximale de l'appareil disponible au laboratoire qui correspond aussi à l'accélération maximale.

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

- la température de centrifugation : fixée à 20°C, température à laquelle la quantité d'huile libre est la plus conséquente.
- le pH de centrifugation :

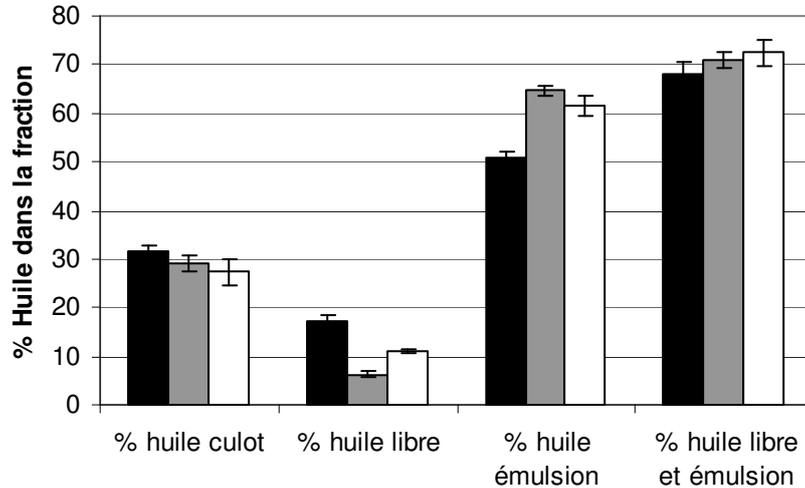


Figure D-12 : Teneur en lipides des différentes fractions après un traitement à l'Alcalase® (2H00, 60°C, pH 8) pour différents pH de centrifugations. Centrifugations respectives à pH 4,1 ■ ; 6,1 ▒ ; 9,1 □ .

Comme on peut l'observer sur la Figure D 12, la teneur en lipides du culot n'est pas fonction du pH de centrifugation, ce qui se traduit par un pourcentage d'huile libre + lipides de l'émulsion plutôt stable en fonction du pH.

Des différences apparaissent toutefois lorsque l'on observe le pourcentage d'huile libre et de lipides dans l'émulsion. C'est à pH 4,1 que l'on observe la plus forte teneur en huile libre (environ 16% alors que cette valeur n'est que de 6% quand la centrifugation est réalisée à pH 6,1). Ceci peut s'expliquer par le fait que ce pH de 6,1 correspond au point isoélectrique moyen des protéines de la graine de colza, pH d'extraction optimal des protéines par précipitation (Rosenthal, 1996 ; Prakash et Rao, 1986). A ce pH, les interactions électrostatiques avec ces protéines sont donc favorisées et l'on peut penser que la « complexation » de celles-ci avec d'autres molécules chargées du milieu peut conduire à une fixation des lipides dans le culot. Ce phénomène semble se confirmer lorsque l'on s'éloigne de ce pH vers des valeurs plus basiques : 9,1 (où les interactions sont plus faibles) qui donne un rendement en huile libre de 11%.

C'est donc la valeur de pH 4,1 qui a été retenue lors des différentes centrifugations réalisées. Elle correspond au rendement maximal d'huile libre et est situé dans une zone de pH pour laquelle les lipides du milieu ne craignent pas de dégradation contrairement à un pH basique qui pourrait induire la formation de savons.

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

2.2.3.2. Suivi de l'action des enzymes par le rendement en lipides des fractions.

2.2.3.2.1. Action des protéases seules : expériences 1 à 9.

Par l'observation de ces résultats, on s'aperçoit que l'Alcalase[®] permet la plus nette extraction de lipides ($76,3 \pm 0,8\%$ en 2 H) et montre le degré d'hydrolyse le plus élevé.

La Neutrase donne un degré d'hydrolyse moins élevé mais permet une libération de lipides intermédiaire ($72,1 \pm 1,0\%$, expérience 5).

La Protamex[®] comme la Flavourzyme[®], malgré un DH(%) équivalent à celui de la Neutrase ne parviennent pas à libérer autant de lipides: respectivement 62% et 63%.

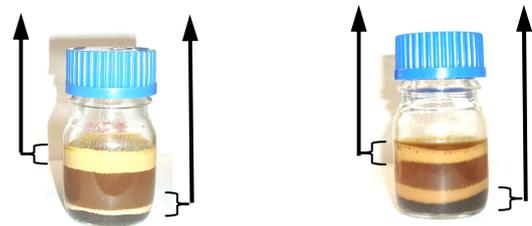
On conclut donc à une efficacité de l'Alcalase[®] supérieure aux trois autres enzymes testées, ce qui confirme les appréciations précédentes.

On peut noter que malgré des degrés d'hydrolyse quasi-identiques à deux heures de réaction pour la Neutrase, la Protamex[®] et la Flavourzyme[®] (environ 35%), le rendement en lipides dans les différentes phases varie. Ceci peut s'expliquer par la spécificité de ces enzymes. On peut penser que les différents sites d'attaques ne permettent pas avec la même efficacité l'hydrolyse des protéines structurales de la graine, ce qui implique des variations dans la libération de lipides dans les deux phases supérieures de centrifugation.

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

Tableau D-6 : Rendements en lipides obtenus par la méthode de Bligh & Dyer des différentes fractions après réactions enzymatique(s).

numéro de l'expérience	Temps de réaction (H)							cumul du rendement en lipides de l'émulsion et de l'huile libre	rendement en lipides résiduels du culot par différence	témoin : cumul du rendement en huile libre et lipides de l'émulsion	témoin : rendement en lipides du culot par différence
	Alcalase [®]	Neutrase [®]	Protamex [®]	Flavourzyme [®]	Pectinex [®]	Cellulast [®]	Viscozyme [®]				
1	1							72,8 (1,4)	27,2	62	38
2	2							76,3 (0,8)	23,7		
3	3							76,5	35,5		
4		1						68,8 (1,2)	31,2	65	35
5		2						72 (1)	28		
6			1					56	44		
7			2					62	38		
8				1				55	45		
9				2				63	37		
10					1			45	55	46	54
11					2			54	46	58	42
12					3			57	43	57	43
13						1		43	57	34	66
14						2		55	45	57	43
15						3		55	45	52	48
16							1	42	58	34	66
17							2	50	50	56	44
18							3	55	45	52	48
19*	1				2			60	40	59	41
20*		1			2			59	41	61	39
21**	1				2			46	54	23	77
22**	2				2			46	54	18	82
23**	3				2			41	59	18	82
24***	2					2		81	19	60	40



Représentation de l'action des différentes protéases et des polysaccharides hydrolases :

Protéases : Alcalase[®] : pH 8, 60°C, ratio E/S : 3% ; Neutrase[®] : pH 7,5, 55°C, ratio E/S : 3% ; Protamex[®] : pH 7,5, 40°C ; Flavourzyme[®] : pH 7,5, 50°C. Polysaccharides hydrolases : Pectinex : pH 4,5, 35°C, ratio E/S : 1%, Cellulast[®] : pH 4,5, 55°C, ratio E/S : 1%, Viscozyme[®] : pH 4,5, 55°C, ratio E/S : 1%.

*Action des protéases puis des polysaccharides hydrolase, **Action des polysaccharides hydrolases puis des protéases, *** action d'une nouvelle cellulase : sigma après l'action de la protéase.

2.2.3.2.2. Action des polysaccharides hydrolases seules : expériences 10 à 18.

Une première lecture des bilans récapitulatifs conduit à observer une augmentation du rendement en lipides lors de la dégradation des parois cellulaires (augmentation du rendement en lipides dans les deux phases supérieures en fonction du temps d'action de l'enzyme). Toutefois, en comparant ces rendements à ceux des témoins sans enzymes, on montre que le rendement en fin d'hydrolyse est équivalent à celui des témoins pour l'ensemble de ces essais.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats de façon plus ou moins indépendante ou globale :

- soit ces enzymes ne sont pas adaptées au substrat,
- soit la présence de lipides dans le milieu perturbe l'action des enzymes qui, de par la présence d'interfaces huile / eau ne trouvent pas de conditions favorables à leur action,
- soit la structure et l'enchevêtrement des polysaccharides de la paroi empêche l'accessibilité aux enzymes utilisées,
- soit il existe dans le milieu des inhibiteurs des réactions de dégradation de la paroi cellulaire.

La bibliographie ne permet pas de conclure quant aux hypothèses énoncées ci-dessus.

En effet, on peut noter l'absence plus ou moins générale des témoins température et homogénéisation (sans enzyme) dans l'ensemble des travaux traitant du sujet.

En se basant sur les résultats d'études qui montrent elles aussi un effet peu distinct des cellulases (Rosenthal, 2001 ; Abdulkarim *et al.*, 2005), mais d'une action favorable lorsque ces deux enzymes agissent en combinaison (Lanzani *et al.*, 1975 ; Olsen, 1988 ; Barrios *et al.*, 1990 ; Yoon *et al.*, 1991), l'emploi de protéases et de cellulases en combinaison a été étudié. L'hypothèse avancée impliquerait que l'hydrolyse des protéines de structure favoriserait l'accessibilité des polysaccharides aux enzymes censées les dégrader.

2.2.3.2.3. Combinaison des deux types d'enzymes.**✓ Protéases puis polysaccharides hydrolases : expériences 19 et 20.**

Les expériences 19 et 20 avec pour protéases respectivement l'Alcalase[®] ou la Neutrase[®] (1H) suivies de la Pectinex[®] 2H montrent des rendements en lipides dans les deux phases supérieures de 60 et 59 %.

En présence de la combinaison de ces deux types d'enzymes, il s'avère que la libération de lipides au niveau des deux phases supérieures se trouve équivalente à celle des deux témoins température (59 et 61%). De plus, l'action favorable de l'Alcalase[®] et de la Neutrase[®] 1H (expériences 1 et 4) sur la répartition en lipides est totalement éliminée (baisse du rendement

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

en lipides dans les deux phases supérieures respectivement de 13 et 10 %). On peut donc en conclure que l'action enzymatique mise en oeuvre, malgré des degrés d'hydrolyse équivalents aux expériences 1 et 4 lors de l'action des protéases, ne parvient pas à libérer les lipides dans les deux fractions supérieures, voire même quelle empêche la répartition souhaitée des lipides dans ces fractions. Ce phénomène est mal expliqué. On peut penser que ces résultats pourraient être liés à la complexité du milieu. Les conditions de pH acide lors de la centrifugation (pH inférieur au point isoélectrique pI) pourraient impliquer des interactions entre les produits néoformés par exemple par coacervation complexe (formation d'interactions électrostatiques entre peptides et polysaccharides) qui engendreraient la précipitation des complexes néoformés ainsi que de lipides dans la phase culot.

Cette étude pourrait donc être complétée par des suivis supplémentaires du pH de centrifugation, mais le nombre non exhaustif de paramètres dont il faut tenir compte a conduit à employer un pH déterminé qui se trouve proche du pH de la dernière réaction enzymatique, ce qui est intéressant du point de vue industriel.

✓ **Polysaccharides hydrolases puis protéases (expériences 21 à 23).**

Comme on peut le constater, ces résultats, témoins comme expérience enzymatique propre, sont très inférieurs à ceux obtenus dans toutes les autres réactions enzymatiques et l'on observe même une baisse du rendement dans les deux phases supérieures en fonction du temps d'hydrolyse (expériences 21 : 46 et 23 : 41%). Ceci est sans doute lié au fait de la très faible quantité d'émulsion récupérée après centrifugation. Cependant, la baisse du rendement en fonction du temps d'hydrolyse reste inexpliquée même si l'on peut supposer l'influence des interactions intermoléculaires du milieu conduisant à une précipitation conséquente.

Le bilan de ces expériences a donc amené à abandonner ce type de traitement enzymatique.

Ces investigations ont montré la difficulté de l'utilisation d'enzymes dans un milieu naturel complexe, et plaident en faveur de l'hypothèse selon laquelle la présence d'inhibiteurs perturbe l'action des polysaccharides hydrolases. L'utilisation d'un nouveau lot de cellulase provenant d'un autre fournisseur mais du même producteur (Sigma Aldrich, C2730, Sigma Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC 26921, aqueous solution, ≥ 700 U/g) a été testé (expérience 24). Il a permis de mettre en évidence une augmentation de lipides dans les deux fractions supérieures de 5 %.

L'ensemble des réactions enzymatiques ont dès lors été effectuées avec l'Alcalase®, comme unique protéase, qui a donné les meilleurs rendements en lipides, en association avec cette nouvelle cellulase.

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

2.2.4. Analyse de la structure de la graine après le traitement enzymatique.

Une analyse en microscopie électronique à transmission a permis de comparer l'état de la cellule avant et après hydrolyse.

Comme on peut le voir sur la Figure D 13 A et B, La compartimentation de la graine a été fortement modifiée. Il n'apparaît plus de structures internes définies au niveau du cytoplasme, tout le matériel semblant avoir migré sur les bords de la cellule. La microscopie ne permet toutefois pas de définir si le cytoplasme de cette cellule est vide, ou si cette vacuole résulte de la fusion des globules lipidiques.

On peut toutefois noter que l'ensemble des parois cellulaires semble demeurer intègre malgré l'action des polysaccharides hydrolases.

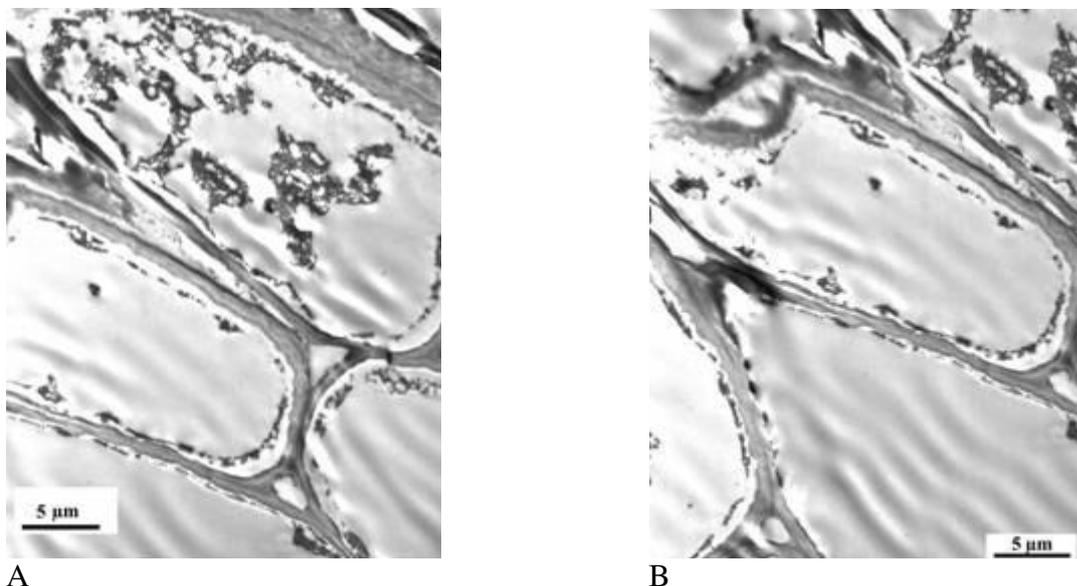


Figure D-13 A et B : Microstructure des cellules de la graine de colza après traitement enzymatique Alcalase® : pH 8, 60°C, ratio E/S 3% ; Cellulase : pH 4,5, 55°C, ratio E/S 1%.

2.3. Conclusions

L'optimisation des réactions enzymatiques a permis de définir les conditions pour lesquelles le rendement en lipides dans les deux phases supérieures est le plus élevé.

Ainsi, l'action favorable d'une protéase, l'Alcalase®, sur ce rendement a été mise en évidence.

De plus, malgré des premières tentatives non concluantes, une cellulase utilisée en combinaison avec l'Alcalase® a permis d'augmenter ce même rendement de 5%.

Les phénomènes conduisant aux variations des teneurs en lipides observées dans les différentes fractions lors de l'utilisation des polysaccharides hydrolases ne sont pas encore

Optimisation de l'hydrolyse enzymatique

expliqués. Ceci est dû à la grande complexité du milieu réactionnel qui implique une multitude d'effets conjugués aboutissant à de tels résultats.

2.4. Perspectives.

Afin d'optimiser les divers rendements d'extraction, une étude plus approfondie des conditions de centrifugation pourrait être envisagée. De par les expérimentations réalisées, il semble évident que cette opération est une des étapes clés du procédé d'extraction aqueuse.

L'action des différentes enzymes modifiant l'équilibre des molécules présentes dans le milieu, on pourrait alors affiner les pH optimaux de déstabilisation du milieu en fonction des différentes enzymes utilisées. Il faut cependant noter qu'une telle adaptation du pH à chaque optimum nécessiterait de nombreuses additions de bases et/ou d'acides donc finalement l'introduction d'espèces salines.

3. Chapitre III : Etudes des propriétés physicochimiques de l'émulsion.

3.1. Etude rhéologique : Mesure de la viscosité de l'émulsion.

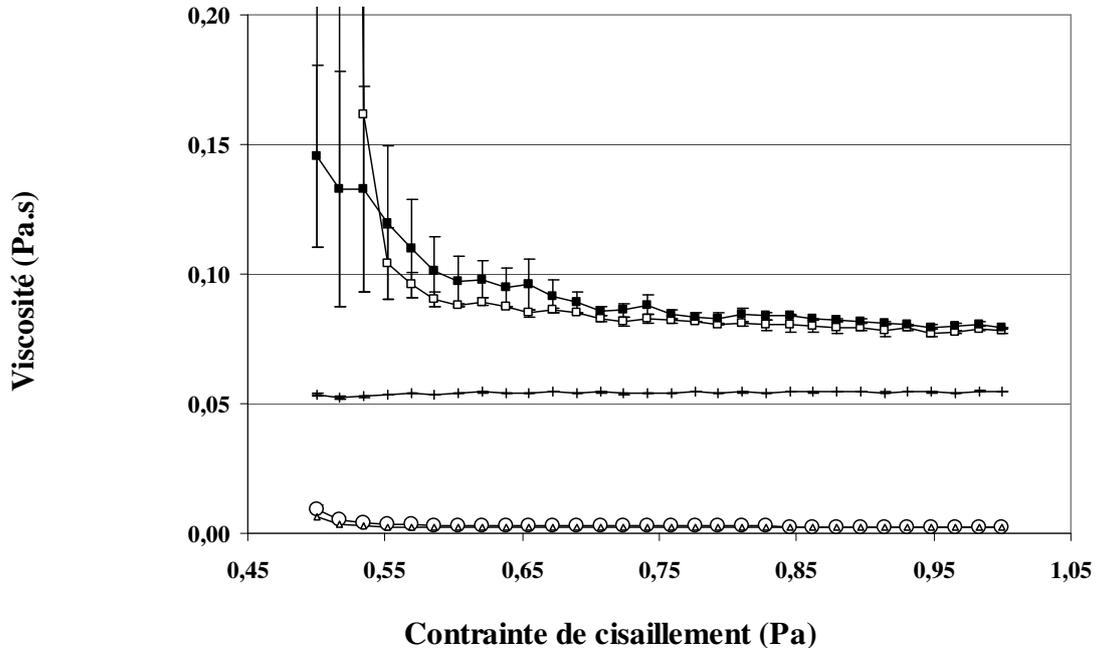


Figure D-14 : Evolution de la viscosité en fonction du milieu à 25°C. Les lipides du culot et des particules de l'émulsion sont obtenus par la méthode de Bligh & Dyer (1959) des fractions. hydrolyse enzymatique (Alcalase®, 2h00, pH 8, 60°C, E/S : 3% et Cellulase, 2h00, pH 4,5, 55°C, E/S : 1%).

-□ - : lipides issus du culot, -■ - : lipides issus des particules de l'émulsion, -| - : huile industrielle (huile winny, Allemagne), -△ - : eau, -○ - : émulsion.

Cette étude de viscosité permet de comparer le comportement de l'émulsion à diverses références aux comportements connus (une huile industrielle et l'eau).

On peut observer sur la Figure D 14 que la viscosité de l'émulsion est proche de celle de l'eau respectivement $2,56 \cdot 10^{-3}$ et $2,21 \cdot 10^{-3}$ Pa.s à 0,85 Pa et 20°C.

En parallèle, les huiles (huile du culot ou de l'émulsion obtenues après traitement enzymatique et huile industrielle) possèdent une viscosité nettement supérieure respectivement $8,41$, $8,06$ et $5,47 \cdot 10^{-2}$ Pa.s à 0,85 Pa et 25°C. La différence de viscosité entre l'huile de colza industrielle et les lipides extraits par la méthode de Bligh & Dyer des fractions peut s'expliquer par la présence de composés résiduels liés au non raffinage de ces lipides qui augmentent la viscosité du milieu.

Caractérisation de l'émulsion

On peut donc noter que l'émulsion a une viscosité proche de celle de l'eau ce qui tend à prouver que nous sommes en présence d'une émulsion huile dans l'eau, suffisamment pauvre en huile.

En retraitant les résultats pour l'émulsion on obtient les résultats présentés dans la Figure D 15. L'observation de cette courbe non linéaire pour la représentation contrainte de cisaillement (σ) = f (vitesse de cisaillement ($\dot{\gamma}$)) permet d'affirmer que le comportement de l'émulsion est non Newtonien.

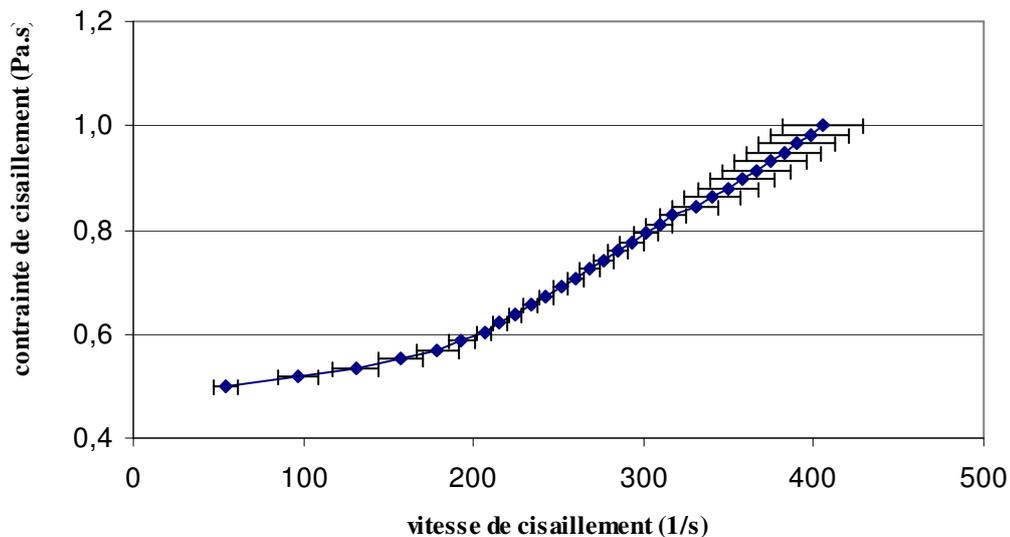


Figure D-15 : Représentation de la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement pour une émulsion obtenue après traitement à l'Alcalase® (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH 4,5, 55°C, 2h, E/S 1%)

Afin d'affiner l'analyse, le tracé de la courbe $\log(\sigma) = f(\log(\dot{\gamma}))$ est réalisé (Figure D 16).

Ce traitement des résultats nous permet de déterminer la loi de puissance régissant ce type de comportement en se basant sur la modélisation décrite par la loi d'Oswald pour les fluides non Newtonien où :

$$\sigma = k (\dot{\gamma})^n$$

soit en représentation logarithmique :

$$\log(\sigma) = \log K + n \log(\dot{\gamma})$$

On peut alors identifier la loi de puissance régissant ce système par la détermination de n.

Pour notre système (n = 0,1959), ce qui correspond à un comportement de type rhéoépaississant.

Ces résultats nous permettent d'affirmer que l'émulsion adopte donc un comportement de type non Newtonien rhéoépaississant, toutefois les expériences menées ne permettent pas de conclure sur la dépendance du système par rapport au temps.

Caractérisation de l'émulsion

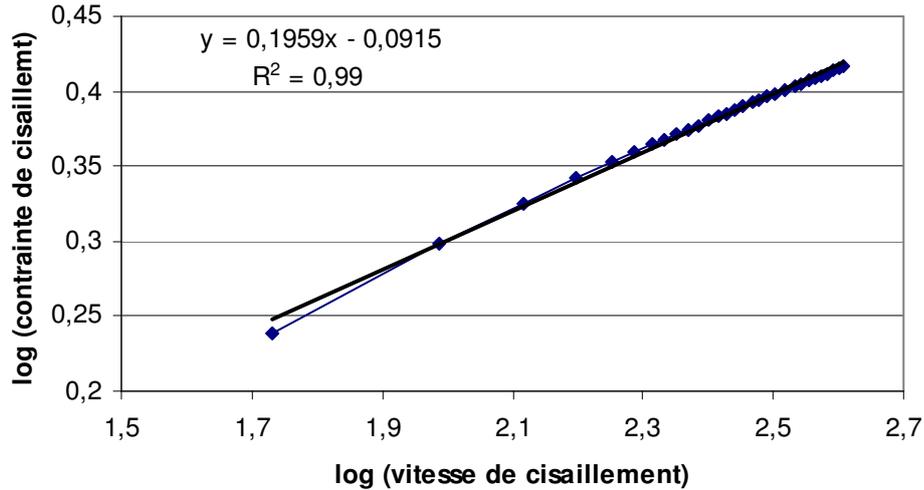


Figure D-16 : Représentation logarithmique de la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement pour une émulsion obtenue après traitement à l'Alcalase® (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH 4,5, 55°C, 2h, E/S 1%).

3.2. Etude granulométrique : analyse de l'émulsion par diffusion statique de la lumière.

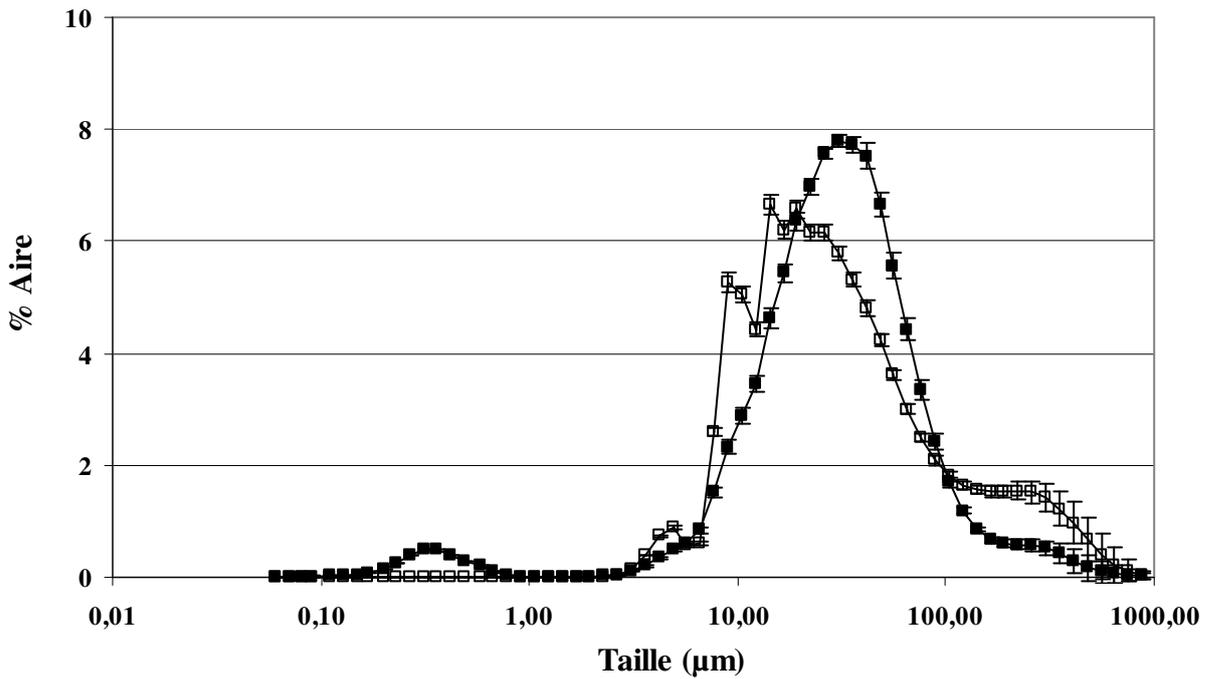


Figure D-17 : Distribution semi-logarithmique de la taille des particules dans l'émulsion après hydrolyse enzymatique par diffusion statique de la lumière (traitement Alcalase®, 2h00, pH 8, 60°C, E/S : 3% et Cellulase, 2h00, pH 4,5, 55°C, E/S : 1%) centrifugation et filtration de l'émulsion) comparaison avec un témoin déshuilé. ■ émulsion, □ témoin déshuilé par la méthode de Bligh & Dyer (1959). Chaque courbe est la moyenne de trois répétitions et leur écart-type associé.

L'analyse semi-logarithmique de la distribution de la taille des particules de l'émulsion présente un profil hétérodispersé (Figure D 17). En effet on peut observer deux tailles évidentes de particules quand on observe le profil de la distribution de l'émulsion (■) : une

Caractérisation de l'émulsion

première population dont le maximum de taille culmine à 0,310 μm et une seconde dont le maximum se situe à 30,53 μm .

Quand on observe le profil du témoin déshuilé, sa répartition semble plus hétérogène que celle de l'émulsion. La population de petite taille a disparu, mais celle correspondant à la population à 0,310 μm est toujours présente avec un profil plus dispersé et différents optima.

Par déduction on peut supposer que la population de petite taille correspond aux globules lipidiques contenus dans l'émulsion malgré une taille très faible.

3.3. Etude microscopique : Observation de l'émulsion par microscopie électronique.

Comme on peut l'observer sur la Figure D 18 réalisée par microscopie électronique, l'émulsion semble contenir un grand nombre de globules de dimensions hétérogènes.

Toutefois, l'observation de cette photographie ne permet en aucun cas de conclure sur la taille des gouttelettes en présence. En effet l'observation étant réalisée entre lame et lamelle, il se peut que l'observation ne se fasse pas sur le même plan focal.

On peut cependant noter la taille de la gouttelette possédant le plus grand diamètre qui correspondrait à la section maximale des gouttes soit 350 μm .

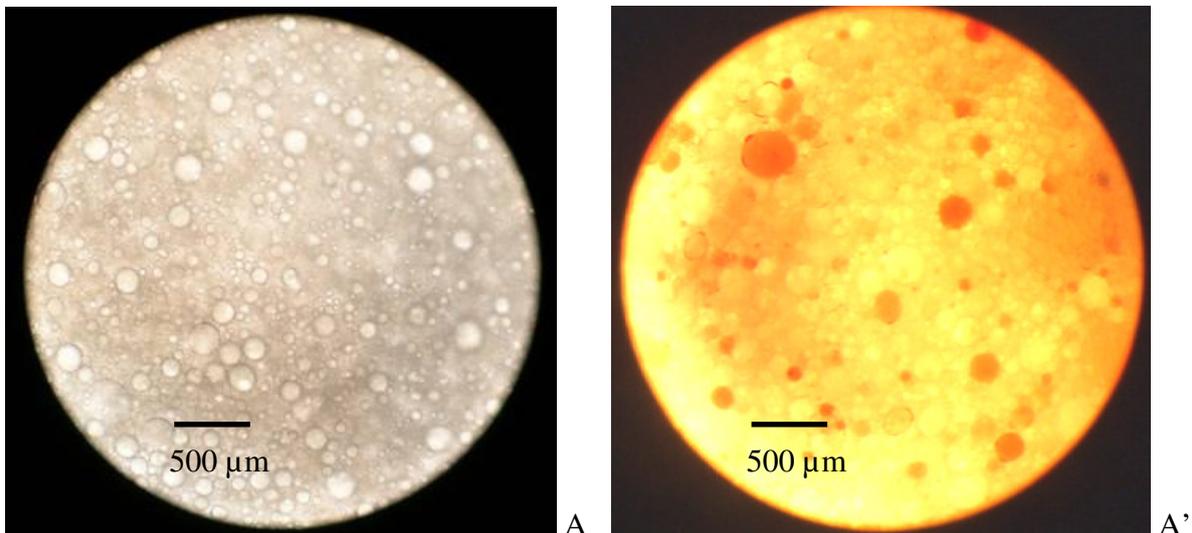


Figure D-18 : Photographie obtenue par microscopie photonique de l'émulsion après un traitement à l'Alcalase[®], 2h00, pH 8, 60°C, E/S : 3% et Cellulase, 2h00, pH 4,5, 55°C, E/S : 1%) avec A') ou sans A) coloration spécifique des lipides au rouge SoudanIII. grossissement x20.

Caractérisation de l'émulsion

Les expériences de granulométrie et d'observations microscopiques ont permis de mettre en évidence des objets de tailles très différentes.

Se pose dès lors un problème d'identification des globules gras.

Les expériences de diffusion statique de la lumière mettent en évidence deux populations avec des maxima à 0,31 et 30,53 μm , alors que les observations microscopiques laissent supposer que la taille des globules paraîtrait beaucoup plus grande.

3.1. Etude de l'émulsion par conductimétrie

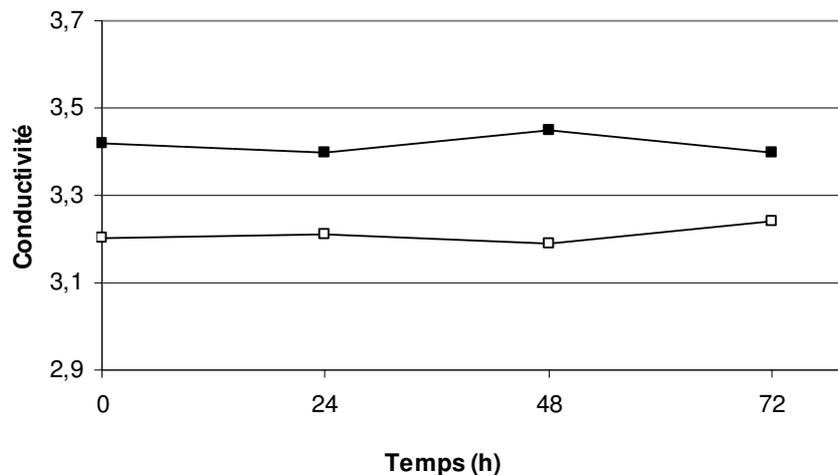


Figure D-19 : Suivi de la conductivité de l'émulsion obtenue après traitement à l'Alcalase[®] (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH4,5, 55°C, 2h, E/S 1%) sur 72 h à 5°C. conductivité en surface ■ , conductivité en fond de flacon □.

Les mesures de conductivité présentées dans la Figure D 19 montrent que sur 72h aucune modification du milieu n'est observée (pas de variation de la conductivité). Ceci tend à prouver que sur cet intervalle de temps l'émulsion ne subit aucune altération physique.

3.2. Suivi du pH de l'émulsion lors de sa conservation.

De même, le suivi du pH lors de la conservation de l'émulsion montre que le pH ne semble pas varier sur une période de 72h. On en conclut de la même façon que sur cet intervalle de temps l'émulsion est chimiquement stable.

Caractérisation de l'émulsion

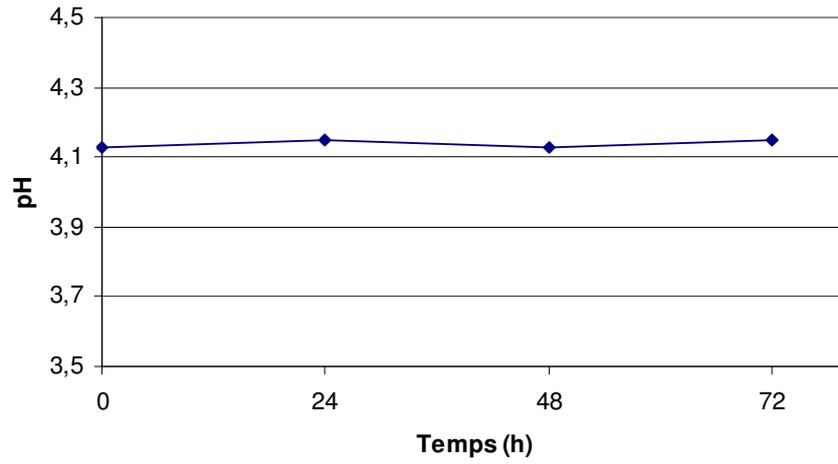


Figure D-20 : Suivi du pH de l'émulsion obtenue après traitement à l'Alcalase[®] (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH4,5, 55°C, 2h, E/S 1%) sur 72 h à 5°C.

4. Chapitre IV : Essais de déstabilisation de l'émulsion.

Les résultats précédents ont montré que l'action des enzymes, en particulier de certains cocktails comme Alcalase[®] + Celluclast[®] conduisaient à une certaine déstructuration de la graine, mais ne permettaient pas une bonne libération de l'huile par centrifugation. La raison est évidemment la stabilité de l'émulsion huile dans l'eau créée dans le milieu. Le chapitre qui suit sera donc dédié aux essais conduits pour déstabiliser cette émulsion, par divers procédés chimiques et physiques.

4.1. Déstabilisation physicochimique.

4.1.1. Déstabilisation par addition d'éthanol.

L'addition d'éthanol à hauteur de 3% sur l'émulsion a permis de mettre en évidence une meilleure libération d'huile. Ceci s'explique par la baisse des tensions interfaciales des molécules du milieu engendrées par l'incorporation de l'alcool. Menon et Wasan en 1985 ont montré que l'addition d'alcool à chaîne moyenne était efficace pour la déstabilisation de l'émulsion dans certains systèmes. Pour eux, deux explications sont possibles :

- 1) l'alcool déplace les molécules de surfactifs de l'interface et forme des membranes interfaciales qui possèdent un degré de protection contre la coalescence plus faible.
- 2) Les molécules d'alcool se positionnent entre les queues des surfactifs. L'optimum de courbure lié à l'interface tend alors vers 0 et augmente alors la probabilité de coalescence.

En résumé, l'éthanol sous conditions spécifiques agit comme un surfactif faible. En affaiblissant l'élasticité de la membrane, il favorise alors la coalescence des gouttelettes d'huile (Wilde *et al.*, 2004).

Ces résultats sont à comparer à ceux obtenus au laboratoire sur la séparation des constituants lipidiques de l'œuf. Après action des protéases, l'addition de l'alcool (2%) injecté dans la cuve avant centrifugation permettait d'améliorer sensiblement la libération d'huile libre (S. Hutin, résultats industriels confidentiels, non publiés). Dans le cas de l'extraction d'huile de colza, il apparaît que le milieu réactionnel (très différent de celui du jaune d'œuf qui ne contient que des protéines et de l'huile) soit beaucoup moins sensible à l'action de compétition de l'alcool aux interfaces. L'amélioration, avec un ajout de 3 % d'alcool donnait une valeur de la quantité d'huile libre de 15,4 % à comparer à 13 % sans ajout.

Cette technique de déstabilisation n'a donc pas été retenue.

4.1.2. Déstabilisation par addition de sel (NaCl).

L'addition de NaCl dans le milieu conduit à une modification de la force ionique du système. Cette modification pouvant induire une déstabilisation de l'émulsion par masquage des forces

Essais de déstabilisation de l'émulsion

de répulsions entre les gouttes, l'addition de NaCl à hauteur de 3% sur l'émulsion a été testée. Ceci n'a pas permis de mettre en évidence sa déstabilisation. Il n'apparaît pas d'huile libre supplémentaire et l'émulsion semble seulement plus compacte (Tableau D 7 et Figure D 21).

Tableau D-7 : tableau récapitulatifs des rendements obtenus lors de l'addition de NaCl à hauteur de 3% sur l'émulsion obtenue après traitement à l'Alcalase® (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH4,5, 55°C, 2h, E/S 1%).

<i>expérience</i>	<i>aspect visuel</i>	<i>% huile phase 1</i>	<i>% lipides phases 1+ 2</i>
<i>témoin</i>	émulsion	14,8	81
<i>addition de NaCl 3%</i>	émulsion plus compacte	14,5	80

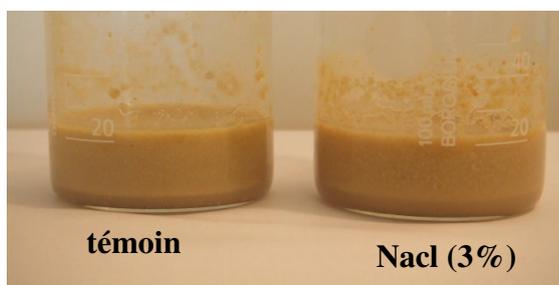


Figure D-21 : Photographie de l'émulsion obtenue après traitement à l'Alcalase® (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH4,5, 55°C, 2h, E/S 1%) et addition de NaCl (3%).

L'addition de sel n'a pas eu d'effet significatif sur la déstabilisation de l'émulsion, contrairement à ce qui a été observé sur certains systèmes modèles, et tout particulièrement dans le cas de la mise en œuvre de surfactifs ioniques, ce qui n'est évidemment pas le cas des émulsions issues de graine végétales.

L'addition de sel n'a donc pas été retenue comme pertinente.

4.1.3. Déstabilisation par addition d'acides.

Afin de jouer sur les propriétés chélatantes de certains acides vis-à-vis des cations, facilitant ainsi l'hydratation des phospholipides et leur élimination dans la phase aqueuse (Nilsson-Johansson *et al.*, 1998, Gibon et Tirtiaux, 1998), mais aussi de par la modification de pH qu'ils engendrent, deux acides ont été testés en vue de la déstabilisation de l'émulsion : l'acide phosphorique et l'acide citrique. Le Tableau D 8 reprend les essais réalisés et les résultats obtenus.

Tableau D-8 : Tableau récapitulatif des rendements obtenus lors de l'addition d'acide phosphorique et d'acide citrique à hauteur de 3% sur l'émulsion obtenue après traitement à l'Alcalase® (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH4,5, 55°C, 2h, E/S 1%).

<i>expérience</i>	<i>aspect visuel</i>	<i>% huile phase 1</i>	<i>% lipides phases 1+ 2</i>
<i>témoin</i>		14,8	81,0
<i>addition de H₃PO₄ (3%)</i>	pas de changement d'état visuel	14,5	80,3
<i>addition acide Citrique 3%</i>	observation de gouttes d'huile en surface. l'émulsion semble moins compacte	15,1	79,7

4.1.3.1. Déstabilisation par addition d'acide phosphorique.

Après addition d'acide phosphorique à hauteur de 3% sur l'émulsion aucun changement d'état n'est apprécié, ni visuellement, ni quantitativement après centrifugation.

L'acide phosphorique n'a donc aucun effet sur la stabilité de l'émulsion. On peut de plus en déduire que les phospholipides ne sont pas les seuls surfactifs impliqués dans la stabilité de cette émulsion. Ceci est d'autant plus surprenant que le dégomme des huiles brutes de colza nécessite la plupart du temps une étape d'acidification pour extraire les phospholipides non hydratés. Il semble bien que dans le cas de l'extraction aqueuse, le rôle des phospholipides non hydratés soit différent, puis que l'ajout d'un acide ne modifie en rien les conditions de centrifugabilité de l'émulsion. Aucun flocculat n'est observé et aucune gomme n'apparaît dans le milieu.

Essais de déstabilisation de l'émulsion

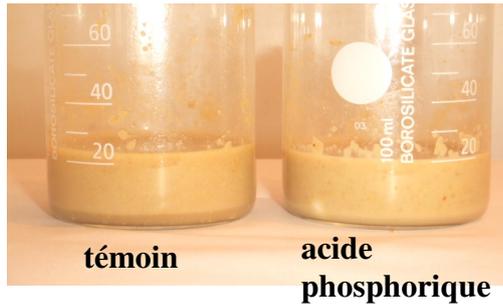


Figure D-22 : Photographie de l'émulsion obtenue après traitement à l'Alcalase® (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH4,5, 55°C, 2h, E/S 1%) après addition d'acide phosphorique.

4.1.3.2. Déstabilisation par addition d'acide citrique.

Après addition d'acide citrique à hauteur de 3% on observe un début de coalescence à la surface de l'émulsion (Figure D 23)

L'émulsion est physiquement modifiée : des gouttes d'huiles sont observées à la surface qui paraît moins compacte et partiellement déstructurée.

La quantité d'huile de la phase 1 et la somme des lipides des phases 1 & 2 sont supérieures au témoin.

L'acide citrique permet une déstabilisation partielle de l'émulsion et sera donc incorporé comme acide pour produire la baisse du pH de 8 à 4,5 lors de l'enchaînement des différentes réactions enzymatiques (passage des conditions de pH optimum de la protéase (8) à celui de la cellulase (4,5)).

La différence de comportement des 2 acides peut s'expliquer par :

- la différence de force des premières acidités : H_3PO_4 : **pKa1 = 2,1** (pKa2 : 7,2 et pKa3 : 12,4), acide citrique ($C_6H_8O_7$), triacide (**pKa1 = 3,1** pKa2 et 3 : 4,76 et 6,4).
- le pouvoir complexant des ions phosphoriques et citriques ne sont en rien comparables
- l'ion PO_4^{3-} ne peut être considéré comme un surfactif même très faible, alors que l'ion citrate peut l'être. Il pourrait ainsi avoir un rôle de type surfactif faible, comme l'alcool précédemment.



Figure D-23 : Photographie de l'émulsion obtenue après traitement à l'Alcalase® (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH4,5, 55°C, 2h, E/S 1%) après addition d'acide citrique.

Essais de déstabilisation de l'émulsion

4.1.4. Déstabilisation par lavage de l'émulsion.

L'addition de 25 volumes d'eau bouillante sur l'émulsion (1 volume) permet une augmentation de l'extraction d'huile libre (de 10% supérieure).

Tableau D-9 : Tableau récapitulatif des rendements obtenus lors de l'addition d'eau sur une émulsion obtenue après traitement à l'Alcalase® (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH4,5, 55°C, 2h, E/S 1%)

<i>expérience</i>	<i>Aspect visuel</i>	<i>% huile phase 1</i>	<i>% Lipides phases 1+ 2</i>
<i>témoin</i>		14,8	81
	Emulsion moins compacte présentant des gouttelettes et conduisant à la libération d'huile libre après centrifugation		
<i>addition vol %</i>		24,6	81

Cette action de lavage aurait pour effet de diluer le milieu en modifiant le ratio solide/liquide du système. Il en résulterait alors une meilleure séparation des lipides. Ceci pourrait aussi être imputable au fait qu'un certain nombre de molécules présentes au niveau de l'émulsion se trouvent solubilisées en phase aqueuse. Elles ne participent donc plus à la stabilisation des lipides au sein de l'émulsion, libérant ainsi la fraction lipidique dont ces molécules permettaient la stabilisation. Toutefois, vu la quantité d'eau nécessaire, cette méthode ne sera pas retenue pour la conduite des travaux ultérieurs. Son exploitation au niveau industriel engendrerait un trop fort surcoût par rapport à la quantité de lipides ainsi libérés, ainsi que la génération d'un problème aigu de dilution des effluents à traiter.

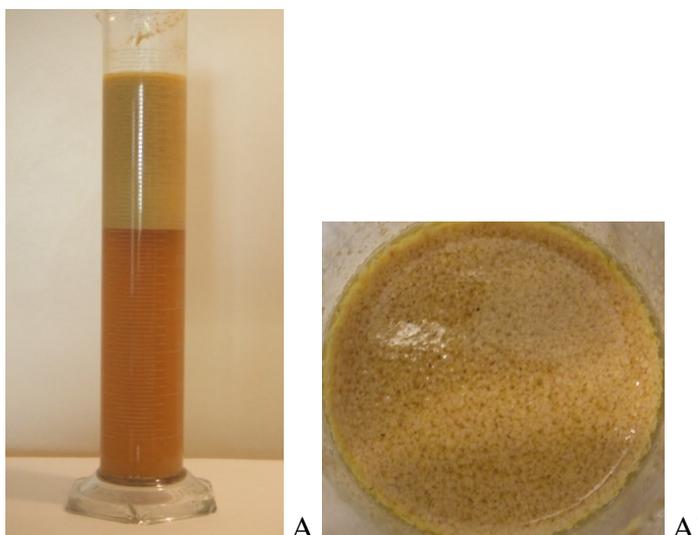


Figure D-24 : Photographie de l'étape de lavage A et de la surface de l'émulsion A' obtenue après traitement à l'Alcalase® (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH4,5, 55°C, 2h, E/S 1%).

4.1.5. Déstabilisation par ajout de talcs.

Des talcs de diverses granulométries sont utilisés dans certains procédés d'extraction de l'huile d'olive, en particulier en cas d'obtention de pâtes difficiles à centrifuger. (P. Delord, essais industriels non publiés, communication personnelle).

La pâte d'olive est broyée et homogénéisée en présence de 3 à 5 % de talc. Après repos à 40°C puis addition d'eau bouillante, la centrifugation est menée à 3500 tr/min en deux étapes séparées par une injection d'eau chaude sur les boues. L'amélioration constatée du rendement global en huile allait de 10 à 30 % suivant la variété d'olives triturées en présence ou non d'assistance enzymatique. Contrairement aux adjuvants précédents, le talc aurait une action purement mécanique de drainage de l'huile.

Après la récupération de l'émulsion (deux centrifugations (centrifugations 1 et 2)), diverses poudres à base de silico-aluminates naturels (talcs) ont été ajoutées au milieu émulsifié débarrassé des phases surnageantes et culot. Une étape d'homogénéisation est alors effectuée sur l'émulsion complétée en eau (1 masse d'émulsion / 2 masses d'eau) à l'aide d'un agitateur pendant trente minutes. Puis le milieu est centrifugé (centrifugations 3) et on compare les quantités de lipides obtenus d'une part en surnageant libre, et d'autre part dans l'émulsion non déstabilisée. Trois talcs de compositions variées ont été testés à deux concentrations différentes (1 et 2% en poids) après addition d'eau ratio 1:1 p/p sur les émulsions récoltées.

talc 1 : *Luzenac*[®], talc 2 : *Stéamic*[®], talc 3 : *Jetfine*[®] (tableau composition et propriétés des talcs : voir Matériels et Méthodes).

Les résultats sont les suivants (Tableau D 10) :

Tableau D-10 : Analyse du pourcentage de lipides dans les fractions après addition de talc à hauteur de 1, 2 et 3% sur une émulsion obtenue après traitement à l'Alcalase[®] (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH4,5, 55°C, 2h, E/S 1%).

Traitements	% huile libre (après centrifugations 1, 2 et 3)	% lipides dans l'émulsion (après centrifugation 3)	% lipides phases 1 + 2
<i>talc 1 1%</i>	45,43	22,92	68,35
<i>talc 1 2%</i>	41,26	12,64	53,90
<i>talc 2 1%</i>	35,12	nd	35,12
<i>talc 2 2%</i>	32,99	34,57	67,56
<i>talc 3 1%</i>	34,01	12,28	46,29
<i>talc 3 2%</i>	40,40	14,17	54,57

avec nd : non déterminé

Essais de déstabilisation de l'émulsion

Clairement, l'addition de talc conduit à une large augmentation de la quantité d'huile libre finalement récupérée. Il apparaît que le "Luzenac[®] 1" donne les meilleurs résultats, alors que paradoxalement, c'est celui qui a la surface développée la plus faible. Ceci indique que la surface spécifique du talc n'est pas le facteur déterminant de cette amélioration. L'explication peut être recherchée dans sa composition (cf tableau C3, section Matériels et Méthodes). Aucune différence flagrante dans la composition de ces 3 produits ne peut expliquer cette propriété. En revanche, la surface spécifique est de 2,4 à comparer à 8 et 21, respectivement, ce qui est une différence considérable. De plus, les sommes de lipides des phases 1 + 2 obtenues finalement montrent que les 2 talcs ayant l'aire de surface spécifique la plus importante conduisent aux extractions totales les plus faibles. Ceci suggère qu'une partie non négligeable des lipides libérables pourrait être adsorbée sur le talc, et n'apparaître pas dans le bilan. Dans ce cas, ce serait bien l'effet mécanique drainant, sans adsorption, qui serait prépondérant.

C'est donc une piste à suivre en perspectives.

4.2. Déstabilisation thermomécanique.**4.2.1. Déstabilisation par dégazage.**

Figure D-25 : Photographie représentative de l'étape de dégazage employée lors du fractionnement du milieu.

La mise en oeuvre d'une étape de dégazage à l'aide d'une pompe à vide avant la centrifugation (10min ; 6000trs / min ; 20°C) du milieu a permis d'augmenter le rendement en lipides dans les deux phases supérieures de 10% sur une réaction enzymatique alliant les effets de l'Alcalase[®] et de la Neutrase[®] (80% donnant 90% de lipides dans les phases émulsion et huile libre).

C'est donc une étape qu'il sera bon d'associer au protocole initial afin d'augmenter le rendement de la réaction. Toutefois, il faut noter que cette opération ne conduit pas

Essais de déstabilisation de l'émulsion

réellement à une déstabilisation des lipides de l'émulsion, mais permet plutôt une meilleure libération des lipides inclus dans le culot (cf. tableau D11).

Tableau D-11 : Résultats des tests de dégazage réalisés à l'aide d'une pompe à vide sur le milieu avant centrifugation.

<i>expérience</i>	<i>% lipides de l'émulsion (phase2)</i>	<i>% d'huile libre (phase 1)</i>	<i>% lipides des phases 1+ 2</i>	<i>% lipides du culot (phase 4)</i>
<i>témoin</i>	66,2	14,8	81,0	19,0
<i>dégazage</i>	75,8	14,1	89,9	10,2

4.2.2. Déstabilisation par filtration sur membrane.

Compte tenu de l'expertise du Laboratoire en matière de filtration sur membrane, et tout particulièrement des travaux de R. Barbar, thèse, 2006, sur la séparation sur membrane des constituants d'émulsions modèles, certaines configurations de filtration ont été testées sur les émulsions issues de la présente étude. Trois séries de tests ont été réalisées :

Test 1 : filtration du milieu sur membrane hydrophobe sur module Amicon : l'essai est conduit avec l'émulsion isolée après centrifugation à température de 20°C, pression de 0,8 bars sur une membrane hydrophobe de type VVHP pendant 15 à 30 minutes. Paradoxalement, aucuns lipides ne traversent la membrane, ce qui signifie que l'émulsion n'est absolument pas déstructurée au voisinage des pores. En revanche, un filtrat aqueux avec en surface quelques irisations huileuses est obtenu. De tels résultats, quelque part surprenants, ont toutefois été décrits et expliqués par R. Barbar dans sa thèse. Cette filtration conduit à un rétentat qui concentre les particules et les lipides, toujours sous forme émulsionnée granuleuse (Figure D 26). Aucune libération lipidique n'est observée.

Essais de déstabilisation de l'émulsion

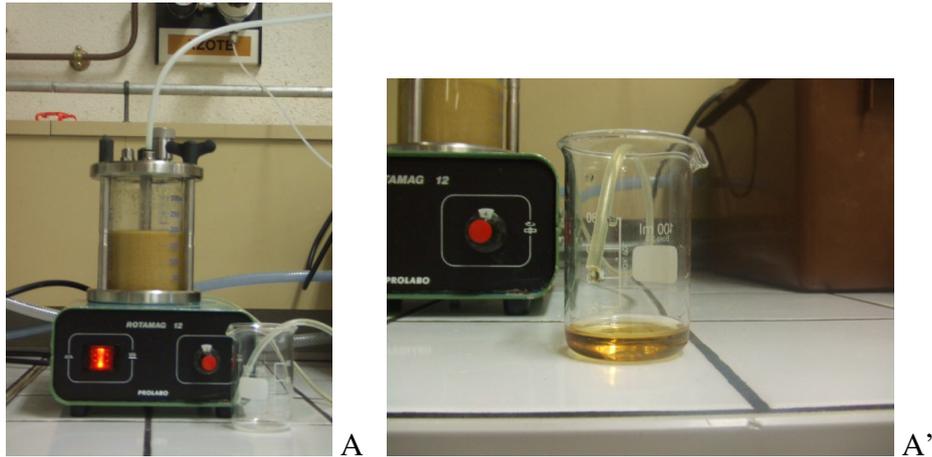


Figure D-26 : Photographie de l'étape de filtration réalisée sur l'émulsion après traitement à l'Alcalase[®] (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH4,5, 55°C, 2h, E/S 1%) à l'aide d'une membrane de type VVHP: A) module de filtration, A') Filtrat aqueux.

Test 2 : L'addition d'eau bouillante sur l'émulsion finale précédemment obtenue ne permet en aucun cas d'extraire l'huile. L'émulsion semble de plus en plus stable. En revanche, le filtrat aqueux apparaît de plus en plus clair. Tout se passe comme si il s'agissait d'un simple lavage de l'émulsion, sans aucune déstabilisation physique.

Test 3 : La troisième configuration testée est celle qui est issue de l'approche par "valve hydrophile – hydrophobe" (R. Barbar, 2006) conduisant à la mise en œuvre dans un module multi-compartiments permettant dans le cas d'émulsions modèles, d'obtenir les phases aqueuses et lipidiques dans des compartiments séparés (Figure D 27). A titre d'exemple, la Figure D 28 montre le résultat d'une filtration d'émulsion d'huile de maïs dans l'eau stabilisée avec du SDS: après 24 h de filtration, la démixtion de 73 % de l'émulsion de départ est obtenue: coté hydrophile, la phase aqueuse ne contient plus que 0,04 % d'huile et inversement, le compartiment hydrophobe contient seulement 1, 6 % d'eau.

Dans le cas de la filtration des émulsions issues de l'extraction enzymatique de l'huile de colza, malgré la diversité des affinités des membranes utilisées (cellulose contre polyéthersulfone), le débit dans les deux compartiments des membranes est identique: aucune démixtion n'est obtenue. Les 2 membranes fonctionnent comme dans le cas de la filtration dans le module unique : elles concentrent l'émulsion au centre sans provoquer de disruption. Seule la phase aqueuse traverse, aussi bien côté hydrophile que côté hydrophobe.

On peut supposer que l'émulsion est trop stable pour être séparée sur des membranes de ce type, et les travaux doivent être poursuivis pour obtenir d'autres matériaux permettant d'avoir une plus grande divergence hydrophile / hydrophobe. Ceci est un challenge difficile, car les

émulsions naturelles sont nettement plus complexes que les émulsions modèle, par nature simplificatrices.

L'association de 2 valves Hydrophobes / Hydrophiles

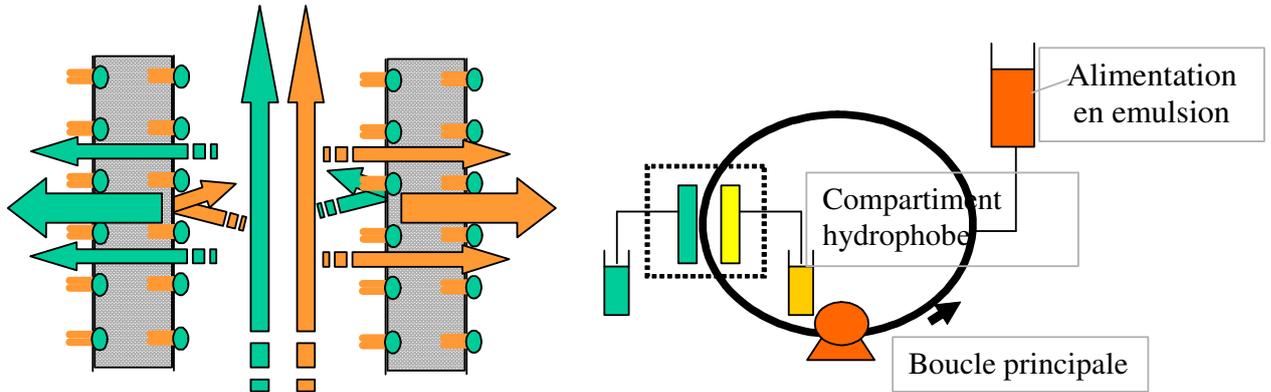


Figure D-27 : montage "tête-bêche" de 2 valves hydrophile / hydrophobe sur la base de l'analogie avec le transistor (schéma de principe et réalisation expérimentale).



Figure D-28 : Photographie permettant de visualiser le résultat d'une filtration d'émulsion d'huile de maïs dans l'eau stabilisée avec du SDS.

4.2.3. Déstabilisation par congélation/décongélation.

Compte tenu des données bibliographiques sur le traitement thermique des émulsions (cf. Etat de l'Art) des essais ont été conduits aussi bien par chauffage que par refroidissement.

Quelles que soient les températures atteintes et les cinétiques de chauffage, les essais en chauffage n'ont donné aucun résultat utilisable concrètement : les variations de rendement restant dans les marges d'erreur expérimentales (Tableau D 12).

Essais de déstabilisation de l'émulsion

Tableau D-12 : Résultats des tests centrifugation à 40°C.

<i>expérience</i>	<i>% lipides de l'émulsion (phase2)</i>	<i>% d'huile libre (phase 1)</i>	<i>% lipides des phases 1+ 2</i>	<i>% lipides du culot (phase 4)</i>
<i>témoin</i>	66,2	14,8	81,0	19,0
<i>température (40°C)</i>	66,3	15,4	81,7	18,3

En revanche, la déstabilisation par refroidissement jusqu'à congélation puis l'utilisation de cycles de congélation / décongélation a donné des résultats intéressants qui sont repris dans le Tableau D 13. De plus l'influence du pré-traitement enzymatique par divers cocktails d'enzymes a été étudiée.

Tableau D-13 : Représentation des rendements en lipides après congélation du milieu lors d'un traitement enzymatique à l'Alcalase® (2H00, pH 8, 60°C, E/S : 3%) et Cellulase (2H00, pH 4,5, 55°C, E/S 1%).

	Alcalase® et congélation	Alcalase® Pas de congélation	Témoin congélation (congélation seule)	témoin * température	Alcalase® Celluclast® congélation	Alcalase® Celluclast® Pas de congélation	témoin congélation (Celluclast® seule)	témoin * température
<i>% lipides du culot (phase4)</i>	28	28	73,7	77	22	25	64	54
<i>% lipides de l'émulsion (phase 2)</i>	42	61	26,2	23	48	60	36	46
<i>% huile libre (phase1)</i>	30	11	traces	traces	30	15	traces	traces

* Les témoins température correspondent au traitement thermique lié à l'emploi d'enzymes mais sans l'ajout d'enzymes.

L'étape de congélation / décongélation ne produit aucune action sur le pourcentage de lipides présent au niveau du culot (voir ligne 1 du tableau), mais les bilans montrent que la quantité d'huile libre est de 30% alors qu'elle n'est que de 11 à 15 % sans congélation dans le cas de l'Alcalase® seule (colonnes 1 & 2).

C'est également le cas lorsque 2 enzymes sont utilisées (colonnes 5 & 6) Alcalase® + Celluclast®, expérience au cours de laquelle l'huile libre passe de 15 à 30 %. En revanche, l'utilisation de la Celluclast® seule ne conduit pas à l'amélioration du rendement en huile

libre (colonne 7 : la grande majorité des lipides reste adsorbée au niveau du culot. Il en est de même en l'absence de traitement enzymatique (témoin "température", colonne 8).

Il apparaît donc clairement que le traitement par congélation décongélation permet une meilleure déstructuration de l'émulsion et en conséquence une plus grande libération spontanée d'huile.

Ceci s'explique par la formation de cristaux de glace qui vont entraîner une modification de la concentration des molécules en présence (Roxas, 1963, US Patent 3,083,365 ; Rochow et Mason, 1936). Lors des étapes de congélation des émulsions, les particules lipidiques deviennent de plus en plus concentrées et viennent en contact les unes des autres par le biais de canaux aqueux non congelés entre les cristaux de glace en formation. La coalescence peut alors avoir lieu en fonction des interactions présentes (Saito, H. *et al.*, 1999).

Par ailleurs, il a été noté que la succession de plusieurs cycles de congélation/décongélation n'apporte pas de meilleur résultat. Il n'y aurait pas d'effet cumulatif de la cristallisation à partir du moment où l'émulsion a déjà été altérée.

Cette opération physique simple peut être retenue comme méthode de déstabilisation de l'émulsion, au même titre en termes de performances que l'ajout de talcs. Sa mise en œuvre à une échelle industrielle peut toutefois poser des problèmes de coûts énergétiques rédhibitoires.

4.3. Déstabilisation par inversion de phase.

Cette technique a été mise en œuvre par analogie avec l'extraction de matière grasse laitière par inversion de phase (barattage). Au cours de cette transformation, on part de lait, une émulsion huile dans l'eau, pauvre en huile (4 %), que l'on déstabilise par chocs pour obtenir l'inversion qui conduit à une phase eau dans l'huile, le beurre, pauvre en eau (16 %) et le rejet d'une émulsion huile dans l'eau, le babeurre, très pauvre en huile (moins de 0,7 %). Les conditions physiques de réalisation de cette inversion sont très pointues en termes de température, stress mécanique, temps. Une transposition au problème de l'émulsion issue de l'extraction enzymatique de l'huile de colza a été tentée dans les conditions suivantes :

La réaction enzymatique a lieu de façon habituelle avec l'Alcalase[®] 2H, pH 8, 60°C, E/S : 3% cellulase 2H, pH 4,5, 55°C, E/S : 1% puis centrifugation. La phase émulsion est récupérée, puis on additionne de l'eau chaude, ratio Emulsion/Eau 1:2 (p/p). Le mélange est refroidi, puis on ajoute de l'huile de colza du commerce à l'aide d'une pompe péristaltique. Cette addition d'huile modifie l'organisation du milieu émulsifié. Cette modification est suivie par conductimétrie, donc par les propriétés de la phase continue. L'addition d'huile est arrêtée au moment où la conductivité chute fortement, signalant l'inversion de phase⁸⁰ : la phase

Essais de déstabilisation de l'émulsion

continue qui était aqueuse (conductrice) est devenue huileuse (isolante). Le mélange est alors centrifugé. La phase supérieure correspondant à une "mayonnaise inverse" (Figure D 29) est alors récupérée, puis passée au four à micro-ondes pendant 15s, ce qui entraîne la démixtion de l'émulsion eau dans l'huile. On réalise alors une nouvelle centrifugation. Cette expérimentation a eu lieu en présence ou en absence de NaCl (1M) ajouté au moment de l'inactivation enzymatique.

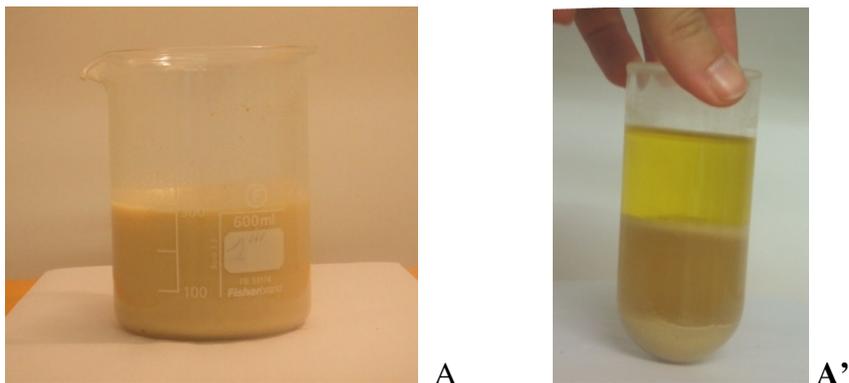


Figure D-29 : Photographie présentant le résultat de l'inversion de phase A) après traitement thermique puis centrifugation A' (traitement enzymatique : Alcalase[®] (pH 8, 60°C, 2h, E/S : 3%) et cellulase (pH4,5, 55°C, 2h, E/S 1%).

Les résultats sont les suivants :

Tableau D-14 : Résultats des tests d'inversion de l'émulsion par ajout d'huile avant centrifugation.

<i>expérience</i>	<i>% lipides de l'émulsion (phase 2)</i>	<i>% d'huile libre (phase 1)</i>	<i>% lipides des phases 1+ 2</i>	<i>% lipides du culot (phase 4)</i>
<i>témoin</i>	66,2	14,8	81,0	19,0
<i>Inversion de phase sans NaCl</i>	80,3	-	80,3	19,7
<i>Inversion de phase en présence NaCl</i>	49,8	30	79,8	20,2

En cas d'addition de sel (NaCl, 1M) au moment de l'inactivation enzymatique, c'est-à-dire avant traitement thermique, l'huile issue de l'émulsion inversée (après addition d'huile exogène) correspond en poids à :

Essais de déstabilisation de l'émulsion

Huile ayant permis l'inversion de phase + huile provenant de l'émulsion initiale soit respectivement 35%, 35%, 20% (3 essais) de l'huile initiale contenue dans les graines qui peut être assimilée à de l'huile libre. Ceci montre en moyenne une augmentation nette de la quantité d'huile libre récupérée, en plus de l'huile ajoutée.

Sans addition de sel, l'intégralité de l'huile ayant permis l'inversion de phase n'est pas récupérée, elle reste donc piégée au sein de la nouvelle émulsion. L'essai est donc négatif dans ce cas.

Ces résultats montrent que l'inversion de phase, sans addition de sel, ne permet pas de résoudre le problème de l'extraction de l'huile. La déstabilisation de cette nouvelle émulsion par traitement thermique n'aboutit pas à une libération de lipides supplémentaire mais au contraire à une incorporation partielle de l'huile ajoutée dans l'émulsion. Ces étapes conduisent finalement à une autre émulsion de composition et de propriétés différentes, mais qui présente une stabilité encore plus forte.

En présence de NaCl dans l'émulsion avant traitement thermique d'inactivation enzymatique, l'inversion de phase conduit à une nouvelle émulsion. Après addition d'huile, le système est déstabilisé par un traitement thermique identique, qui conduit à la libération d'une partie de l'huile incluse dans l'émulsion de base soit 30% des lipides totaux de la graine. C'est un résultat très intéressant qui permet de parvenir à un rendement en huile plus conséquent sans passer par une phase (onéreuse) de congélation. Cette observation montre que l'addition de sel a modifié la phase aqueuse et ses relations avec l'interface de telle sorte que le système possède alors une plus faible résistance au traitement thermique.

Ceci peut s'expliquer par la capacité des sels à masquer les charges à la surface des gouttes ce qui favorise la coalescence par la minimisation des forces de répulsion, entraînant une plus grande libération finale d'huile par traitement thermique. Ceci est en accord avec les travaux de Kim *et al.*, 2002 qui ont montré que l'addition de sel pouvait amener à une déstabilisation de l'émulsion et que le moment d'incorporation de ce sel jouait un rôle prépondérant dans l'établissement des interactions qui conduisent à une plus ou moins grande stabilité de l'émulsion finale.

4.4. Déstabilisation par traitement aux ultrasons.

L'utilisation d'ultrasons (2 heures, puissance maximum (130 w), pH 5,8 : pH initial du milieu sans modification) a été mise en œuvre sur le broyat de graines et sur le milieu hydrolysé. Les résultats sont résumés dans le Tableau D 15 ci-dessous.

Le premier test (ultrason sur milieu broyé) a donné des rendements équivalents à toutes les expériences antécédentes en termes de % lipides dans le culot et % lipides dans l'émulsion.

Le second test (Ultrasons sur le milieu hydrolysé) n'a pas donné de rendements satisfaisants. Après traitement, 30% des lipides se retrouvent dans le culot. Il semble donc que l'application d'ultrasons sur le milieu après hydrolyse favorise la rétention des lipides dans le culot.

Toutefois, on peut noter que, dans une publication traitant de l'utilisation des ultrasons, Shah *et al*, 2005 montrent que l'emploi d'ultrasons sur le substrat *Jatropha curcas* (5 g de graines pour 30ml d'eau) en vue d'une hydrolyse enzymatique (protéase, 18h) favorise la libération de l'huile et limite le temps d'utilisation des enzymes dans ces conditions particulières. La durée du traitement doit être limitée (5min à pH 9) et conduit à une augmentation du rendement en lipides de 69% à 75% suite à un traitement enzymatique réduit de 18 à 6 heures.

Tableau D-15 : résultats du traitement aux ultrasons sur la graine entière ou sur l'émulsion avec action de l'Alcalase® 1 ou 2H (pH: 8 ; 60°C ; E/S : 3%).

	<i>ultrasons sur le milieu contenant des graines broyées puis traitement enzymatique pH 5,8</i>				<i>ultrasons sur l'émulsion après traitement enzymatique pH 4,5</i>			
	<i>expérience 1.1 Alcalase® 1H</i>	<i>expérience 1.2 Alcalase® 1H</i>	<i>expérience 2.1 Alcalase® 2H</i>	<i>expérience 2.2 Alcalase® 2H</i>	<i>expérience 3.1 Alcalase® 1H</i>	<i>expérience 3.2 Alcalase® 1H</i>	<i>expérience 4.1 Alcalase® 2H</i>	<i>expérience 4.2 Alcalase® 2H</i>
% lipides dans le culot (phase 4)	15,7	17,9	25,0	27,8	33,0	27,2	25,12	25,16
moyenne et (écart-type)	17 (1)		26 (2)		28 (3)		25 (0,01)	

Ces remarques et les résultats qui ont été obtenus conduisent à considérer que l'utilisation des ultrasons n'apporte pas de contribution significative à la libération de lipides suite à l'extraction aqueuse appliquée à la graine de colza. Manifestement, les propriétés des milieux émulsifiés obtenus sont très dépendantes du substrat de départ, puisque des résultats

intéressants ont été publiés sur d'autres extractions. En revanche, les ultrasons sont souvent utilisés comme aide à la déstructuration des tissus avant extraction par solvant, ce qui n'est pas comparable.

Conclusions sur les tests de déstabilisation de l'émulsion:

Dans cette étude, nous avons mis en œuvre toutes les techniques disponibles et précédemment utilisées dans d'autres contextes pour déstabiliser une émulsion. On peut noter que l'homogénéisation à hautes pressions n'a pu être testée, un matériel performant n'étant pas disponible au laboratoire.

Dans tous ces essais, la quantité d'huile libre récupérée dans la phase 1 de centrifugation a été considérée comme indicateur d'une déstabilisation de l'émulsion. Par ailleurs, la quantité de lipides adsorbée dans le culot (perdue pour l'extraction) a été également considérée, sa minimisation concourant à un meilleur rendement global. Compte tenu de tous ces facteurs, 3 techniques apparaissent intéressantes, au moins en termes de contribution à un meilleur rendement direct en huile libre. Dans l'ordre d'efficacité, dans les conditions de nos expériences :

- *l'ajout de talcs à faible surface spécifique* a montré une bonne efficacité par le biais d'un "drainage" mécanique de l'huile à partir de l'émulsion. Des améliorations de l'ordre du triplement de la quantité d'huile libre récupérée en centrifugation de l'émulsion ont été obtenues. Notons par ailleurs que le talc n'a pas été pour l'instant utilisé dans la première étape de broyage avant traitement enzymatique, ce qui suggérerait les résultats obtenus en huilerie d'olive. Ce sont des essais qui sont à mettre en perspectives, en relation avec les fournisseurs de talcs.
- *Les cycles congélation / décongélation* : ils conduisent à un doublement de la quantité d'huile libérée à la centrifugation. En revanche, l'accumulation de cycles n'apporte pas de libération supplémentaire. C'est une technique physique facile à mettre en œuvre mais chère au niveau industriel, compte tenu de l'énergie nécessaire. Toutefois, la technique a été considérée comme pertinente, et a fait l'objet d'une étude d'optimisation par planification expérimentale (chapitre suivant).
- *L'inversion de phase avec addition de sel*: l'ajout d'huile pour obtenir l'inversion de phase n'est efficace pour le rendement final en huile extraite que lorsque du sel NaCl est ajouté avant la dénaturation thermique des enzymes. Dans ce cas, une augmentation de l'ordre du doublement de l'huile directement centrifugeable est

obtenue, ce qui constitue un résultat intéressant puisque comptabilisé déduction faite de l'ajout nécessaire pour inverser l'émulsion.

Une 4^{ème} technique apparaît intéressante, car elle permet surtout la réduction des lipides adsorbés au culot, qui se retrouvera dans le tourteau. Il s'agit du dégazage du milieu avant centrifugation, qui favorise la désorption des gaz dans les phases concrètes et entraîne une meilleure coalescence lors de la centrifugation, d'où un meilleur rendement de la séparation. Ce dégazage, opération simple à mettre en œuvre, devrait être appliqué dans tous les cas.

Toutes les autres additions et traitements (addition d'acides, de sel, d'alcool, traitement par la chaleur, lavages de l'émulsion, filtration sur membrane, ultrasons) n'ont pas donné de résultats intéressants dans les conditions de nos expériences. Toutefois, ce sont des pistes qui restent pertinentes d'un point de vue théorique et citées dans la littérature, mais dont la mise en œuvre nécessiterait probablement des études paramétriques plus complètes.

5. Optimisation de la déstabilisation de l'émulsion par congélation : Utilisation d'un plan d'expériences.

Conformément aux conclusions de la partie précédente la congélation, qui apparaît comme pertinente pour la déstabilisation de l'émulsion a fait plus particulièrement l'objet d'une optimisation par plan d'expériences.

5.1. Choix de la méthodologie de recherche expérimentale.

Plutôt qu'une méthode d'expérimentation classique, souvent longue, coûteuse et ne reflétant que l'influence d'un paramètre en fixant le niveau de tous les autres, le choix s'est porté sur l'emploi de la Méthodologie de la Recherche Expérimentale. Cette méthode a pour avantage de permettre la détermination de l'influence des facteurs intervenant au cours de l'hydrolyse enzymatique d'un substrat hétérogène complexe ainsi que de leurs interactions.

5.2. Choix des variables.

Le choix des variables sur ce domaine a été dicté par l'ensemble des expérimentations préalablement réalisées au laboratoire. Après avoir déterminé l'association des deux enzymes permettant l'obtention du rendement en huile le plus conséquent (Alcalase[®] et Cellulase) et leurs conditions optimales d'hydrolyse. Par ailleurs, il a été décidé de déterminer dans la même étude quelle était la durée d'action optimale de chaque enzyme utilisée successivement à leur propre pH optimum.

De plus le nombre de congélations jouant sur la structure du milieu semblait également essentiel à définir, compte tenu des résultats préliminaires.

5.3. Définition du domaine expérimental.

Le domaine expérimental et les niveaux des variables, retenus pour l'étude de la modélisation du procédé (présentés dans le chapitre "*Matériels et Méthodes*"), ont été déterminés à partir des expérimentations préliminaires.

Plusieurs réponses expérimentales ont été mesurées à l'intérieur du domaine expérimental par le biais d'essais déterminés par une matrice de Doehlert (Tableau D 16). Ces réponses pertinentes sont :

Plan d'expériences

- a) Le degré d'hydrolyse (DH (%)) en fonction du temps dont le suivi a été réalisé par la méthode du pH-Stat à 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutes en fonction des conditions opératoires.
- b) Le pourcentage de lipides dans le culot, dosé par la méthode de Bligh & Dyer (1959) en fin de réaction.
- c) Le pourcentage de lipides dans l'émulsion dosé par la méthode de Bligh & Dyer en fin de réaction.
- d) Le pourcentage d'huile libre dosé par méthode gravimétrique en fin de centrifugation.
- e) Le taux d'azote dans la phase hydrolysats dosé par la méthode de Kjeldhal.

Seules trois des cinq réponses ont été retenues du fait de leur significativité :

<p>η_1 : la teneur en lipides du culot exprimée en g/100g de lipides du milieu initial</p> <p>η_2 : la teneur en huile libre exprimée en g/100g de lipides du milieu initial</p> <p>η_3 : la teneur en lipides de l'émulsion exprimée en g/100g de lipides du milieu initial</p>
--

Chacune de ces réponses peut être représentée par une équation polynomiale du second degré, valable sur l'ensemble du domaine expérimental.

$$\eta_j = \beta_{j0} + \sum_{i=1}^3 \beta_{ji} X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{jii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{jij} X_i X_j$$

où η_j représente les variables dépendantes, X_i les variables indépendantes, β_{j0} le terme constant, β_{ji} les coefficients linéaires de premier ordre, β_{jii} les termes carrés, β_{jij} les termes d'interaction. Les valeurs retenues sont récapitulées dans le tableau ci-dessous.

Tableau D-16 : Domaine expérimental et niveau de distribution des variables utilisées lors de l'hydrolyse enzymatique et le traitement de congélation.

variables indépendantes	symbole	niveaux	valeurs expérimentales
<i>Alcalase</i> [®] temps de traitement (heures)	X1	5	0 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4
<i>Celluclast</i> [®] temps de traitement (heures)	X2	7	0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3
nombre de congélations	X3	3	0 ; 1 ; 2

Plan d'expériences

A partir de ces variables et de leurs différents niveaux, le logiciel NEMROD[®] génère le tableau d'expérience qui comprend 13 essais plus 3 répétitions au centre du domaine afin de déterminer l'erreur expérimentale (Tableau D 17).

Ce tableau donne la matrice expérimentale et les résultats sur les réponses sélectionnées.

Tableau D-17 : Valeurs expérimentales pour les réponses (Y1 : teneur en lipides du culot , Y2 : teneur en huile libre, Y3 : teneur en lipides de l'émulsion) en fonction des expériences dictées par la matrice uniforme de Doehlert ayant trois variables (X1 : temps de traitement de la Celluclast[®], X2 : temps de traitement de l'Alcalase[®], X3 : nombre de congélations.)

numéro de l'expérience	Celluclast [®] temps d'action (h)	Alcalase [®] temps d'action (h)	nombre de congélations	teneur en lipides du culot (%)	teneur en huile libre (%)	teneur en lipides de l'émulsion (%)
	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3
1	4,0	1,5	1,0	21,4	17,1	61,5
2	0,0	1,5	1,0	22,5	16,7	60,9
3	3,0	3,0	1,0	17,2	11,6	71,2
4	1,0	0,0	1,0	43,5	10,7	45,9
5	3,0	0,0	1,0	32,1	21,8	46,0
6	1,0	3,0	1,0	17,8	16,3	65,9
7	3,0	2,0	2,0	25,3	22,3	52,4
8	1,0	1,0	0,0	28,8	7,6	63,6
9	3,0	1,0	0,0	24,8	5,0	70,2
10	2,0	2,5	0,0	23,9	13,1	63,0
11	1,0	2,0	2,0	18,5	12,4	69,1
12	2,0	0,5	2,0	25,9	13,1	61,0
13	2,0	1,5	1,0	23,1	24,0	52,9
14	2,0	1,5	1,0	24,1	23,7	52,2
15	2,0	1,5	1,0	22,5	21,9	55,6
16	2,0	1,5	1,0	23,6	23,4	53,0

Les répétitions effectuées au centre du domaine expérimental (expériences 13 à 16), sont utilisées pour le calcul de l'erreur expérimentale. L'analyse de variance et la régression multilinéaire sur les différentes réponses expérimentales sont respectivement présentées dans le tableau ci-dessous, qui donne la qualification des résultats en terme statistiques (Tableau D 18).

Il est à noter que les coefficients de régression multiples sont corrects pour Y1 (teneur en lipides du culot) et Y2 (teneur huile libre), mais faible pour Y3 (teneur en lipides de

Plan d'expériences

l'émulsion). Ceci s'explique par le fait que la détermination de la quantité en lipides de l'émulsion a été effectuée par différence entre la quantité de lipides totaux de la graine et les quantités déterminées pour l'huile libre et les lipides du culot. Il y a donc cumul des erreurs expérimentales sur ces données. Par ailleurs, compte tenu des petites quantités mises en œuvre, il était difficile d'appliquer dans toutes les phases l'extraction la méthode de Bligh & Dyer.

Tableau D-18 : régression multilinéaires sur les différentes réponses expérimentales étudiées : (Y1) teneur en huile du culot, (Y2) teneur en huile libre, (Y3) teneur en huile de l'émulsion.

	Y1	Y2	Y3
<i>coefficient de régression multiple (R²)</i>	0,87	0,90	0,65

Tableau D-19 : Analyse de variance des différentes réponses expérimentales étudiées : (Y 1) rendement en huile du culot et (Y 2) rendement en huile libre et (Y3) teneur en huile de l'émulsion

source de variation	degrés de liberté	somme des carrés			carré moyen		
		Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
régression	9	519,74	498,23	354,15	57,75	55,36	39,35
résidus	6	76,81	57,14	190,27	12,80	9,52	31,71
validité	3	75,34	54,69	165,01	25,11	18,21	55,00
erreur	3	1,48	2,51	25,26	0,49	0,84	8,42
total	15	596,55	555,37	544,42			

L'analyse de la variance fournit des indications sur la validité du modèle et les erreurs associées à chaque type de réponses.

Finalement, les coefficients des équations du modèle pour chaque réponse sont donnés dans le Tableau D 20 pour les réponses Y1, Y2 et Y3.

Plan d'expériences

Tableau D-20 : Récapitulatif des coefficients des modèles quadratiques pour les réponses les réponses : (Y 1) rendement en lipides du culot et (Y 2) rendement en huile libre.

<i>estimation des coefficients</i>	<i>rendement en lipides du culot (Y1)</i>	<i>rendement en huile libre (Y2)</i>	<i>teneur en lipides de l'émulsion (Y3)</i>
<i>b0</i>	23,315***	23,250***	76,620 ***
<i>b1</i>	-1,421	1,838	-0,955
<i>b2</i>	-9,814**	0,602	7,224 *
<i>b3</i>	-1,598	4,507*	-1,037
<i>b11</i>	-1,375	-6,355	-0,630
<i>b22</i>	6,235	-8,762*	-5,970
<i>b33</i>	0,620	-12,710**	5,590
<i>b12</i>	6,195	-9,157*	-1,617
<i>b13</i>	4,423	10,905*	3,866
<i>b23</i>	1,892	-2,619	-3,210

* : 1% < a ≤ 5% ; ** : 1% < a < 1% ; *** : a < 1%

5.4. Analyse des résultats.

Le Tableau D 20 permet d'évaluer l'impact de chaque facteur sur les réponses Y1 et Y2.

Plus un facteur aura un effet important en valeur absolue (positif ou négatif suivant le sens de l'action) plus son influence sera significative par rapport au paramètre étudié. Il en découle l'analyse au cas par cas pour toutes les réponses étudiées dans le cadre du plan.

L'analyse des effets obtenus pour les différentes réponses montre que le temps d'hydrolyse par la Celluclast® (X1), par l'alcalase® (X2) ou le nombre de congélation (X3) a un effet positif sur le contenu en lipides du culot (valeurs *négatives* du facteur se traduisant par une plus faible masse de lipides dans le culot, ce qui est recherché).

Les résultats obtenus montrent que le temps d'action de la protéase (-9,814) a pratiquement 9 fois plus d'influence que les deux autres facteurs pour le rendement en lipides du culot (b1 :-1,421 et b3 : -1,598). Ceci peut s'expliquer par l'hydrolyse des protéines de structure facilitant la libération des globules gras par centrifugation. Ce résultat est cohérent avec l'étude paramétrique qui avait déjà souligné l'importance de l'action protéasique dans la déstructuration de la graine.

Plan d'expériences

En ce qui concerne l'huile libre, le facteur prépondérant se trouve être le nombre de congélation avec un coefficient de 4,507 les deux autres facteurs ayant des coefficients plus faibles (1,838 et 0,602). Ceci est en accord avec les résultats précédents : la libération spontanée d'huile surnageant est favorisée par l'action de la congélation. L'effet de la congélation serait particulièrement important au niveau de la phase émulsifiée contrairement à son action sur la phase lourde du culot.

L'analyse de la troisième réponse fait ressortir l'influence positive de la durée de protéolyse ($b_2 : 7,224$) sur le rendement en lipides émulsionnés. Ce phénomène peut s'expliquer par une augmentation du degré d'hydrolyse qui favorise la libération de petits peptides stabilisant l'émulsion.

Les résultats expérimentaux peuvent être édités sous forme de courbes d'isoréponses générées par le logiciel Nemrod à partir des modèles quadratiques. L'exploitation de ces courbes permet de visualiser et de déterminer les conditions optimales de l'hydrolyse enzymatique ainsi que le nombre optimal de congélations valable dans le domaine expérimental.

En fixant le niveau d'un des trois facteurs il est alors possible de suivre l'évolution des paramètres deux à deux sur des graphes appelés courbes d'isoréponses.

Ces courbes sont données dans les tableaux qui suivent, paramètre par paramètre :

5.4.1. *Courbes isoréponses du pourcentage de lipides dans le culot.*

Le pourcentage de lipides dans le culot est clairement influencé par le temps d'action de l'Alcalase[®] (Figure D 30):

Ainsi, plus la durée d'action de l'Alcalase[®] est élevée plus le pourcentage de lipides dans le culot est amoindri (Figure C25a). En revanche, le temps d'action de la cellulase n'a pas d'effet significatif, sauf pour un temps d'action de la protéase supérieur à 2h (cadre supérieur gauche). Sur la figure b, on peut observer que la congélation n'a pas d'influence sur le contenu en lipides du culot alors que sur la même figure le temps d'action de l'Alcalase[®] est toujours prépondérant. Ceci confirme les résultats obtenus précédemment.

Dans la figure c, le temps d'action de la protéase étant fixé au centre du domaine (facteur prépondérant), l'influence relative des deux autres facteurs est représentée. On observe un plateau correspondant à un domaine étendu où la réponse % de lipides dans le culot est constante.

a

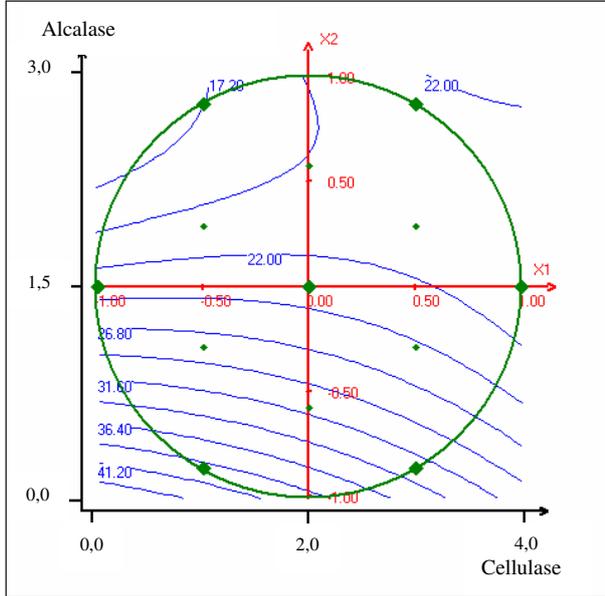
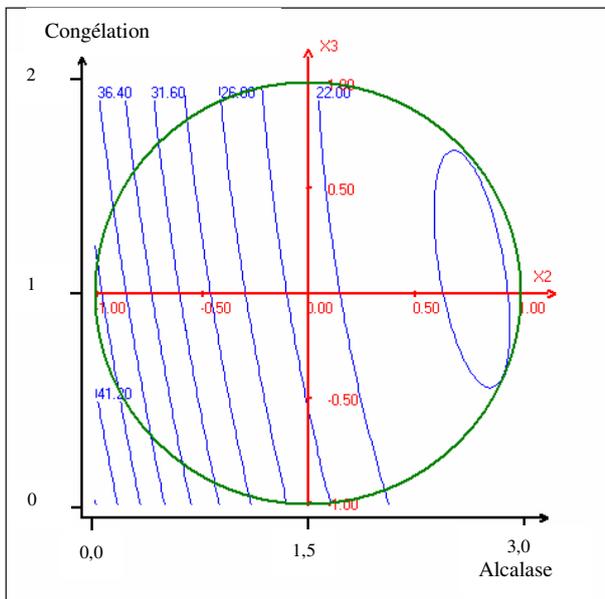


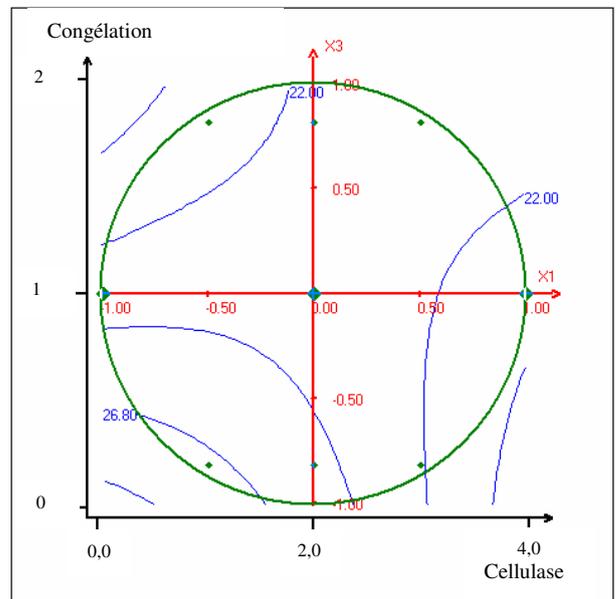
Figure D-30 : Optimisation du rendement en lipides du culot en utilisant le plan d'expériences.

- a) Courbes isoréponses pour l'effet du temps de traitement de l'Alcalase[®] et de la Celluclast[®] sur le rendement en lipides du culot. (nombre de congélation fixé à 1).
- b) Courbes isoréponses pour l'effet du temps de traitement de l'Alcalase[®] et du nombre de congélations sur le rendement en lipides du culot. (temps de traitement de la Celluclast[®] fixé à 2h00).
- c) Courbes isoréponses pour l'effet du temps de traitement de la Celluclast[®] et du nombre de congélations sur le rendement en lipides du culot. (temps de traitement de l'Alcalase[®] fixé à 1,5h00).

b



c



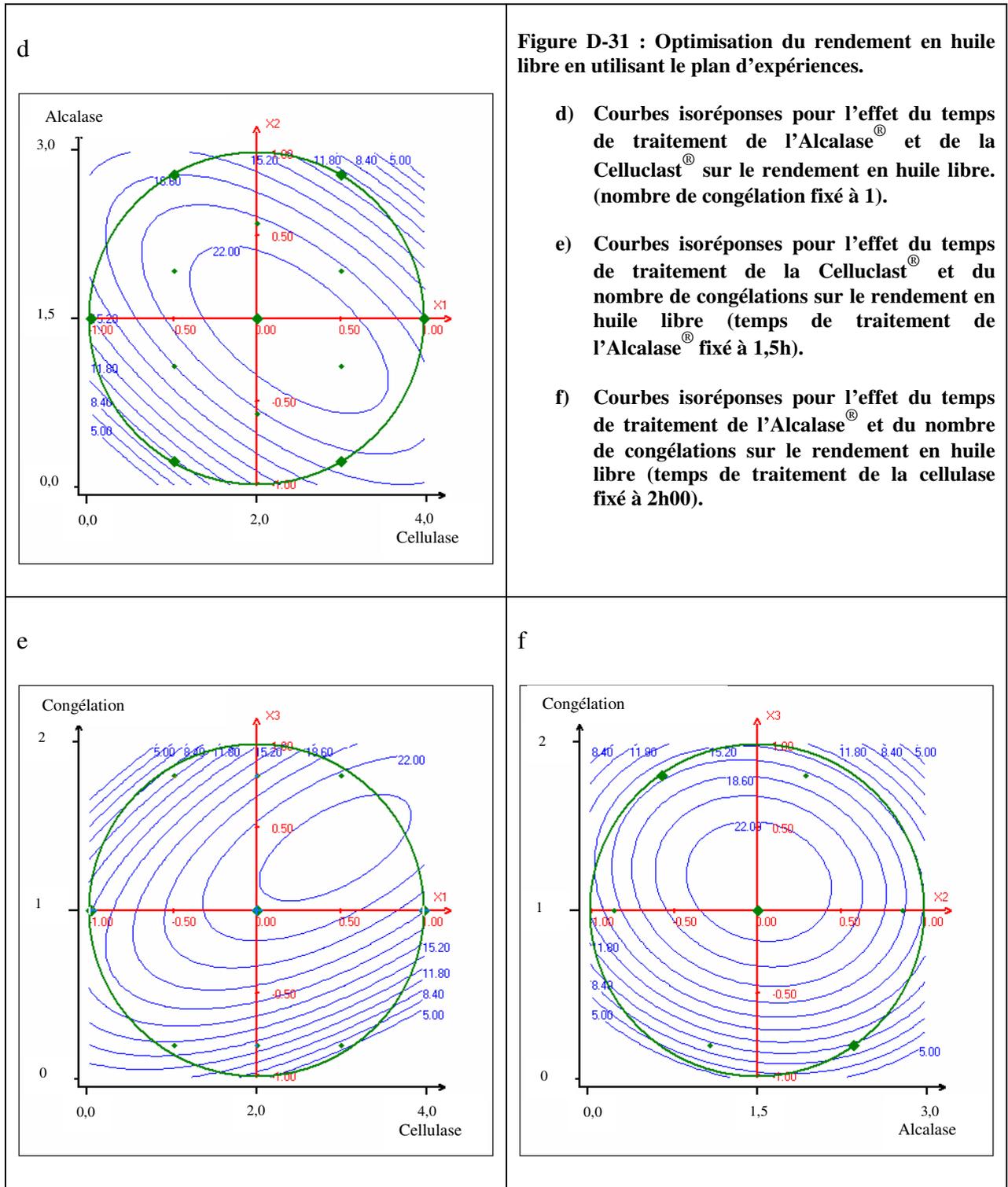
5.4.2. Courbes isoréponses du pourcentage d'huile libre.

Les courbes d'isoréponses du pourcentage d'huile libre sont présentées dans la Figure D 31.

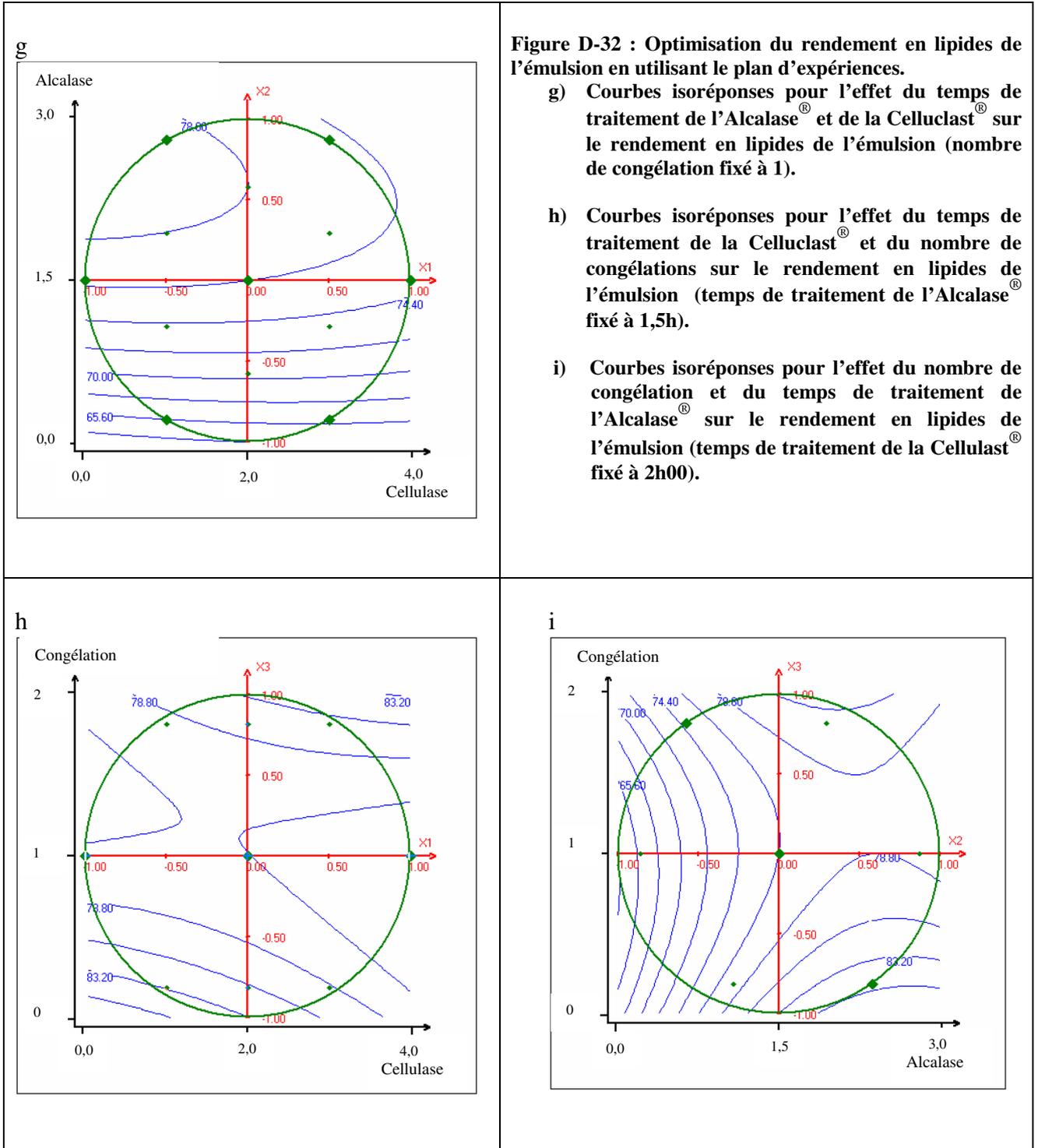
Celles-ci permettent de visualiser les optima qui sont présents dans le domaine expérimental. Ainsi, on peut définir des zones où la réponse du pourcentage d'huile libre sera optimale. En se plaçant au centre des optima, on peut définir les conditions suivantes pour un rendement maximum en huile libre de 22%

- courbes d (effet des temps de traitement à l'Alcalase[®] et à la cellulase, nombre de congélations fixé à 1): temps d'action de la cellulase (2 heures), temps d'action de l'Alcalase[®] (1,5 heures), nombre de congélations (1).
- courbes e (effet du temps de traitement de la cellulase et du nombre de congélations, le temps de traitement à l'Alcalase[®] étant fixé à 1,5 heure) : on observe les mêmes conclusions.
- courbes f : (effet des temps de traitement à l'Alcalase[®] et du nombre de congélations, le temps de traitement à la cellulase étant fixé à 2 heures) : l'interprétation conduit au même résultat.

Plan d'expériences



5.4.3. Courbes isoréponses du pourcentage de lipides dans l'émulsion



La Figure D 32g présente un profil similaire à celui de la Figure D 30a faisant encore une fois ressortir l'importance du temps de protéolyse sur l'action polysaccharide hydrolase de la Celluclast®. Les Figures D 32h et i, quant à elles, présentent un profil en forme de vallée qui correspond à la définition d'un domaine où le pourcentage de lipides est minimal.

Plan d'expériences

A ce stade de l'analyse, il apparaît que l'utilisation de la protéase permet certes une libération de lipides du culot qui se retrouvent dans la phase émulsionnée, mais ne libère pas l'huile sous forme libre.

Outre la détermination des effets principaux des facteurs, la méthodologie des plans d'expériences permet de quantifier les différentes interactions entre les modalités étudiées.

Le Tableau D 20 présente pour les trois réponses étudiées des interactions élevées significatives (%huile libre) qui permettent d'affiner l'optimisation de chacune des réponses.

Ce phénomène d'interdépendance est évident dans le cas de cette expérimentation, puisque la quantité de lipides qui diminue dans une des phases se retrouve finalement dans les autres, un facteur influent sur l'une l'est donc forcément sur l'autre.

Dans la figure qui suit (Figure C 33), le tracé des courbes de chemin optimal permet la visualisation des paramètres en tenant compte des effets principaux et des interactions entre les différents facteurs.

Afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce type de diagramme, l'exemple suivant est proposé. Pour la réponse de l'optimisation du rendement en lipides du culot la démarche logique est la suivante par l'analyse des Figures D 33 A et A'.

On cherche à minimiser la présence d'huile dans le culot. Au regard de la Figure D 33 A et en observant plus particulièrement la partie gauche de la figure A (minimisation), On s'aperçoit qu'une amélioration est possible.

Pour cela il faut au regard de la Figure D 33 A' partie gauche :

- augmenter le temps d'action de l'Alcalase (courbe 2) et le nombre de congélation (courbe 3),
- réduire la durée d'action de la Cellulase (courbe 1).

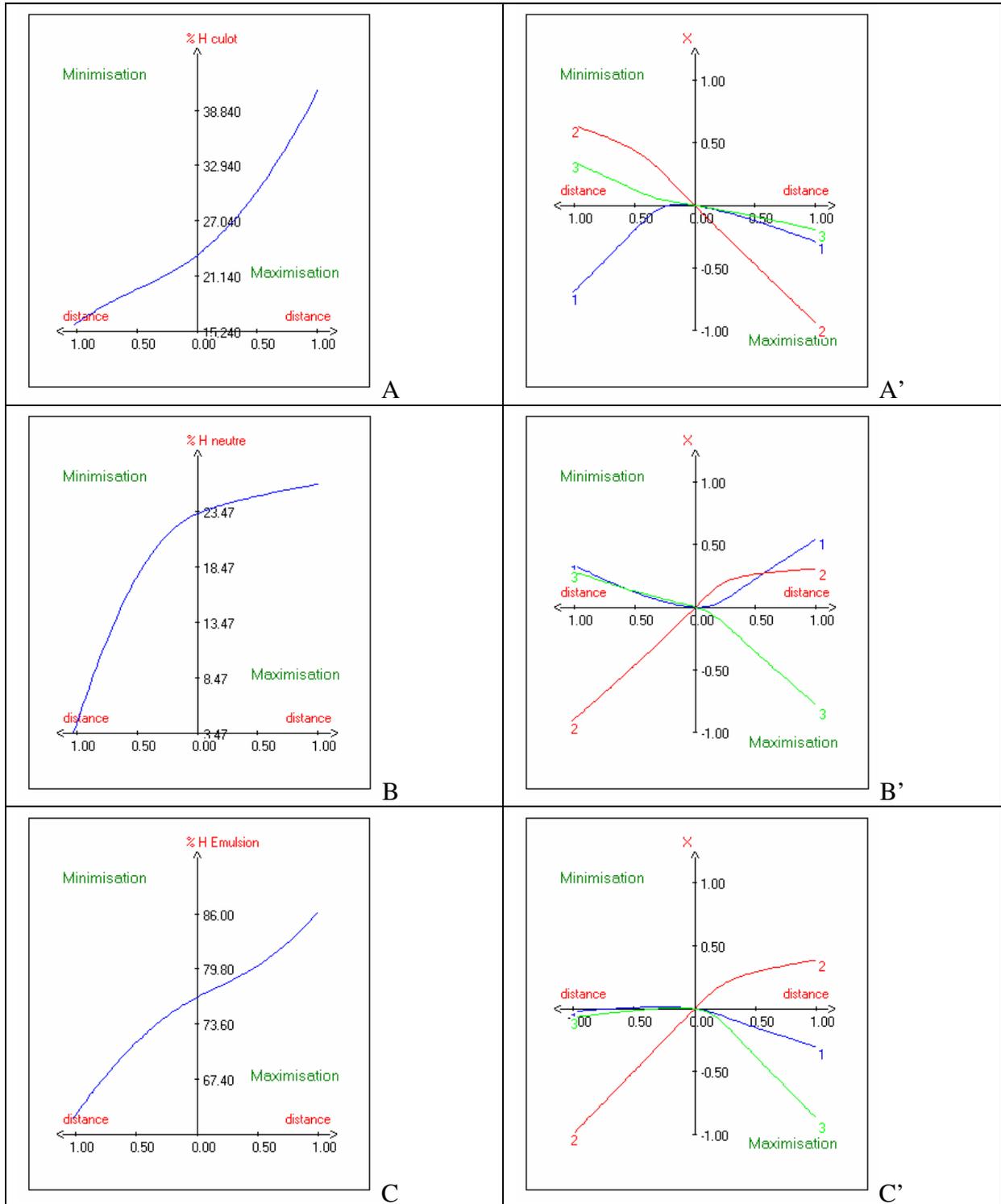
L'analyse des figures est alors de la façon suivante :

La prédiction du chemin optimal (en variables centrées réduites) pour minimiser la teneur en lipides du culot consisterait à limiter le temps d'action de la cellulase tout en augmentant le nombre de congélation et le temps de protéolyse. En ce qui concerne la maximisation de l'huile libre, les niveaux des facteurs choisis au centre du domaine de l'étude correspondent quasiment à la réponse optimale (voir Figure D 33 B à droite).

L'analyse du chemin optimal pour le rendement en lipides de l'émulsion confirme l'impact majeur du temps d'action de l'Alcalase[®] au détriment des deux autres facteurs afin d'obtenir une extraction de l'huile de la graine de colza sous forme d'émulsion.

Plan d'expériences

Figure D-33 : Chemins optimaux A et A' : rendement en lipides du culot ; B et B' : rendement en huile libre ; C et C' : rendement en lipides de l'émulsion.



Conclusions du plan d'expériences :

Le plan d'expérience permet de valider l'ensemble des résultats précédents et confirme les tendances observées :

- importance de l'Alcalase[®], donc du temps d'hydrolyse avec cette enzyme ; les courbes d'isoréponses permettent de déterminer un temps optimal compris entre 1,5 et 2 heures.
- La Celluclast[®] n'est pas prépondérante, mais apparaît toutefois la nécessité d'un temps d'hydrolyse optimal autour de 2 heures.
- Enfin l'impact de la congélation est confirmé dès le premier cycle pour le rendement en huile libre. En revanche, elle n'influence pas la quantité de lipides dans le culot.

Conclusions et perspectives

A l'heure actuelle, l'extraction de l'huile de colza se fait à l'aide d'un procédé en deux étapes correspondant à un pressage suivi d'une extraction de l'huile résiduelle par l'hexane. Bien que très efficace du point de vue économique, ce procédé reste discutable sur certains aspects :

L'utilisation d'hexane engendre un certain nombre de contraintes et risques industriels. Ce composé hautement inflammable peut être la source d'explosions lors du procédé d'extraction mettant en péril la vie des opérateurs et nécessitant donc une surveillance accrue et des dispositions de sécurité importantes (les usines qui l'utilisent sont classées "SEVESO 2". L'utilisation d'hexane aboutit à la libération de composés participant à l'effet de serre donc dommageables pour l'environnement. Par ailleurs, les produits finis contiennent une quantité non nulle de solvant résiduel, dont l'effet délétère sur la santé humaine est avéré.

En outre, le tourteau produit lors de cette extraction, valorisé en nutrition animale possède de faibles propriétés nutritionnelles en comparaison à d'autres sources de protéines végétales (présence de composants antinutritionnels, protéines et fibres avec de faibles capacités d'assimilation) en particulier en comparaison avec son concurrent numéro 1, le tourteau de soja, dont la digestibilité est meilleure.

Face à ce constat, ce travail a été motivé par la mise au point d'une méthode alternative d'extraction ayant pour perspectives l'obtention d'une huile de colza de haute qualité et la production d'un tourteau aux propriétés nutritionnelles mieux optimisées.

L'extraction aqueuse assistée par des enzymes a donc été mise en oeuvre en raison des réponses qu'elle pourrait apporter à l'ensemble de ces contraintes de sécurité alimentaire et environnementale, de par la qualité des produits de consommation humaine et animale susceptibles d'être obtenus, et l'innocuité des rejets et effluents produits.

Dans un premier temps, afin de définir le matériau expérimental, la graine de colza employée a été caractérisée. Les analyses physicochimiques de la graine et de ses constituants ont permis de définir la composition de la graine en azote, en huile et en minéraux ainsi que l'analyse de la qualité des lipides totaux obtenue par la méthode de Bligh & Dyer.

Par la suite, des réactions d'hydrolyses enzymatiques ont été testées avec des protéases et de polysaccharides hydrolases (9 au total) utilisées seules ou en combinaison, afin

d'optimiser la teneur en lipides dans les deux phases supérieures du milieu après centrifugation, à savoir l'huile libre et la phase émulsionnée.

Le suivi de ce traitement enzymatique a été réalisé par des mesures du degré d'hydrolyse lors des essais par protéolyse, et de teneur en azote de la phase hydrolysate lors de l'action des polysaccharides hydrolases. La détermination de la teneur en lipides des différentes fractions a été obtenue grâce à des extractions par la méthode de Bligh & Dyer sur les phases séparées par centrifugation. Des analyses de microscopie électronique en transmission ont été effectuées afin de suivre l'évolution de la structure du milieu et en particulier de caractériser la dégradation des cellules du tissu végétal gras et le devenir des corps lipidiques.

A l'issue de ces travaux préliminaires, deux enzymes agissant en combinaison ont été sélectionnées en raison de l'augmentation du rendement en lipides dans les 2 phases supérieures qu'elles apportaient. Les enzymes adoptées sont les suivantes : l'Alcalase[®] 2,4L de Novozyme A/S et une cellulase de Sigma Aldrich.

Après définition de la meilleure combinaison enzymatique, les paramètres expérimentaux optimaux (concentrations en enzymes, température, pH, ratio solide / liquide) pour l'utilisation de l'Alcalase[®] et de la cellulase en combinaison ont été les suivants, respectivement : pH 8, 60°C, E/S : 3%, ratio solide / liquide 1/4, 2 heures ; et pH 4,5, 55°C, E/S : 1%, ratio solide liquide 1/4, 2 heures). L'accent a ensuite été porté sur la recherche de procédés permettant la déstabilisation de l'émulsion et sa caractérisation afin de maximiser le pourcentage d'huile libre obtenue, considéré comme paramètre indicateur d'une bonne extraction de l'huile de la graine.

Afin de définir les caractéristiques de l'émulsion, un certain nombre de techniques analytiques ont été mises en œuvre :

- * microscopie photonique : réalisation de clichés de l'émulsion.
- * diffusion statique de la lumière aux petits angles : caractérisation de la taille des gouttelettes de l'émulsion.
- * mesure de viscosité
- * mesure de pH : évolution du pH de l'émulsion dans le temps fin de déterminer sa stabilité.
- * mesure de conductivité : évolution de la conductivité de l'émulsion afin d'apprécier les éventuels changements d'état.

Malgré l'apparente facilité à appréhender les caractéristiques d'une émulsion modèle lors de l'étude bibliographique, la nature complexe du système issu de la graine de colza en

phase aqueuse complique considérablement l'approche expérimentale : présence de nombreux composants, taille hétérogène des particules, milieu opaque et inhomogène, fragilité à la conservation... Tous ces facteurs rendent les techniques habituelles de caractérisation difficilement exploitables. De ce fait, de nombreux effets, nets sur les milieux modèles, apparaissent plutôt comme des tendances dans les systèmes réels.

Afin d'optimiser le pourcentage d'huile libre obtenue, des modifications physicochimiques ont été mises en œuvre : l'addition de sel (NaCl), d'acides (phosphorique et citrique), l'addition de silices de talcs, l'addition d'eau ou d'huile exogène.

D'autre part des essais de déstabilisation thermomécanique ont été réalisés : le dégazage, l'emploi des ultrasons sur la graine entière broyée ou après hydrolyse enzymatique, la congélation-décongélation.

Parmi les méthodes testées, quatre d'entre elles conduisent à une amélioration significative des rendements en lipides.

Tout d'abord, la mise en oeuvre d'une étape de dégazage avant la centrifugation des milieux réactionnels conduit à une nette amélioration (+ 10 % environ) du pourcentage de lipides dans les deux phases supérieures.

De plus trois autres méthodes de déstabilisation de l'émulsion se sont avérées intéressantes.

- ✓ La congélation / décongélation qui permet un gain de 15% d'huile libre par rapport au bilan de base.
- ✓ L'addition d'huile exogène concomitante à un traitement thermique en présence de sel qui conduit à la récupération de 30% d'huile libre, soit le double de la référence.
- ✓ L'addition de talcs qui amène elle aussi à des rendements en huile libre nettement supérieurs, jusqu'à 45% d'huile libre soit le triple.

Les perspectives de ce travail sont les suivantes :

Si la décongélation / décongélation a fait l'objet d'un plan d'expérience, les deux dernières méthodes de déstabilisation s'avèrent prometteuses mais n'ont pas été optimisées faute de temps. Il est clair qu'un paramétrage plus fin, et éventuellement une optimisation par méthode empirique apporterait des éléments intéressants dans les 2 cas ci-dessus, l'inversion par addition d'huile exogène en présence de sel et l'addition d'un *faciliteur* mécanique comme le talc. Ces 2 techniques ont par ailleurs l'avantage d'avoir déjà fait l'objet d'applications industrielles : l'inversion de phase dans la production de beurre et le talc dans la centrifugation de l'huile d'olive. Elles sont donc transposables, en tenant compte des spécificités du milieu et des contraintes industrielles. De plus, l'utilisation de

combinaisons de méthodes de déstabilisation efficaces individuellement, lors d'une seule et même expérience, permettrait de déterminer si des effets de synergie sont observables, qui pourraient conduire à une certaine additivité de la quantité d'huile libre extraite par centrifugation directe.

En ce qui concerne l'amélioration du rendement en huile libre, une autre méthode de déstabilisation pourrait s'avérer intéressante : l'homogénéisation haute pression. Elle n'a pas été étudiée ici mais sa pertinence ne saurait être négligée. Là encore, les conclusions peuvent s'avérer contradictoires, puisque habituellement, la diminution des tailles de gouttelettes par homogénéisation conduit à une meilleure stabilité des émulsions aussi bien dans les modèles que dans la réalité (*cf* le lait). Mais l'inverse peut très bien être observé, en fonction de l'environnement moléculaire de l'interface et des phénomènes énergétiques.

D'autre part, lors de ce travail, l'étude s'est essentiellement concentrée sur la qualité de l'huile obtenue et sur la déstabilisation de l'émulsion engendrée lors du processus d'extraction aqueuse. Toutefois, l'huile n'est pas l'unique produit valorisable de la graine de colza, et une approche globale de création de valeur dans les 2 phases, d'une part l'huile, d'autre part le tourteau en nutrition animale nécessiterait une analyse plus poussée du culot de centrifugation et de la phase hydrolysate. La valorisation des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des co-produits résultant de cette extraction est un élément essentiel dans le bilan économique global du procédé. Or, la qualité nutritionnelle et fonctionnelle du tourteau est également fortement dépendante des conditions d'extraction, et tout particulièrement de la phase enzymatique. De ce fait, une optimisation globale de l'ensemble de ces paramètres avec les 2 sorties que constituent une huile de qualité obtenue avec un rendement adéquat d'une part, et un tourteau de haute digestibilité d'autre part. Ainsi on pourrait envisager l'étude des propriétés fonctionnelles des peptides de ces deux fractions en évaluant leur solubilité, leurs propriétés émulsifiantes et leur distribution de taille. De plus, afin de valider l'amélioration attendue du point de vue nutritionnel animal, la valeur nutritionnelle de l'hydrolysate pourrait être déterminée par la détermination de l'indice chimique (détermination de l'aminogramme et acides aminés essentiels de l'hydrolysate), du Coefficient d'Efficacité Protéique (enregistrement du gain de poids d'un lot de rats sur 28 jours)...

D'un point de vue plus fondamental, les problèmes liés à l'action des polysaccharides hydrolases, et au constat qui en découle sur l'importance de l'accessibilité des

polysaccharides aux enzymes, une étude plus poussée de la nature, de la structure et de l'organisation des polysaccharides de la graine pourrait être envisagée. On pourrait alors espérer une amélioration des rendements par l'optimisation de l'utilisation des polysaccharides hydrolases censées déstructurer les parois végétales, ce que manifestement elles ne font que de manière très partielle aujourd'hui.

De plus, ces procédés étant à vocation industrielle, une étude des coûts induits par la mise en oeuvre de ces techniques comparativement aux procédés hautement optimisés actuels, permettrait d'évaluer la rentabilité et donc l'avenir industriel de cette voie technologique. Il faudrait alors chiffrer l'ensemble des investissements nécessaires, les prix de revient industriels des produits finis dans un approche globale de *bioraffinerie*, estimer la valeur ajoutée en termes de qualité et d'image, d'impact sur l'environnement...

C'est un challenge technico-économique qui ne manque certainement pas d'intérêts.

Références bibliographiques

- Abdulkarim, S. M., Long, K., Lai, O.M., Muhammad, S. K. S., Ghazali, H. M. (2005). Some physico-chemical properties of Moringa oleifera seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. *Food Chem.*, 93 (2), 253-263.
- Abismaïl, B., Canselier, J. P., Wihelm, A. M., Delmas, H., Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Chem.*, 6, 75-83.
- Abismaïl, B., Canselier, J. P., Wihelm, A. M., Delmas, H., Gourdon, C. (2000). Emulsification processes: On-line study by multiple light scattering measurements. *Ultrasonics Chem.*, 7, 187-192.
- Ackman, R. G. (1990). Canola fatty acids: an ideal mixture for health, nutrition, and food use. In *Canola and Rapeseed, Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology*, F. Shahidi (Ed.), Avi Book, Van Nostrand Reinhold, New York, 6, 81-98.
- Ackman R. G. (1998). Remarks on official methods employing boron trifluoride in the preparation of methyl esters of fatty acids of fish oils. *J. A. O. C. S.*, 75, 541-546.
- Adler-Nissen, J. (1977). Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Process Biochem.*, 12 (6), 18-23.
- Adler-Nissen, J. (1984). Control of the proteolytic of bitterness in protein hydrolysis process. *J. Biol. technol. Biotechnol.*, 32, 138-156.
- Adler-Nissen, J. (1986). In *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London et New-York, 1-425.
- AFSSA, Rapport : Acides gras de la famille oméga-3 et système cardiovasculaire : intérêt nutritionnel et allégations. 10 juillet 2003, 1-70.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., Serra, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochem.*, (33) 1, 21-28.
- Allen, D. A. (1997). Refining. In *Lipid Technologies and Applications, Part II : Processing*, F.D. Gunstone, G.D. Gunstone (Eds), Marcel Dekker, New-York, 137-168.
- Al-Shamrani, A. A., James, A., Xiao, H. (2002). Separation of oil from water by dissolved air flotation. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 209, 15-26.
- Anderson, A. J. C. (1953). Removal of fat-soluble impurities. In *Refining of Oils and Fats for Edible Purposes*, A. J. C. Anderson (Ed.), London, UK: Pergamon Press, 26-90.
- Andréasson, E., Bolt Jørgensen, L., Höglund, A. S., Rask, L., Meijer, J. (2001). Different myrosinase and idioblast distribution in Arabidopsis and Brassica napus. *Plant Physiol.*, 127 (4), 1750-1763.
- Arora, A., Chrism, G. W., Shellhammer, T. H. (2003). Rheology and stability of acidified food emulsions treated with high pressure. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2591-2596.
- Anson, M. L. (1939). The reactions of denatured egg albumin with ferricyanide. *J. Gen. Physiol.*, 23, 247-261.
- Bair, C. W., Snyder, H. E. (1980). Electron microscopy of soybean lipid bodies. *J.A.O.C.S.*, 279-282
- Barbar, R. (2006). Contribution à la mise au point de nouveaux matériaux membranaires pour la filtration de milieux complexes: étude physicochimique de membranes d'acétate de cellulose et de méthylcellulose partiellement alkylée obtenues par immersion précipitation. Thèse de l'INPL.
- Barrios, V. A., Olmos, D. A., Noyola, R. A., Lopez-Munguia, C. A. (1990). Optimization of an enzymatic process for coconut oil extraction. *Oléagineux*, 45, 35-42.
- Bayley's industrial oil and fat products (1996). In *Edible oil and fat products: oils and oilseeds*. vol. 2, 5^{ème} ed., YH. Hui (Ed.), John Wiley and Sons Inc., New-york, USA, 241-269.

- Beg, Q. K., Bhushan, B., Kapoor, M., Hoondal, G. S. (2000). Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces sp.* QG-11-3. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.*, 24 (6), 396-402.
- Beg, Q. K., Bhushan, B., Kapoor, M., Hoondal, G. S. (2000). Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from *Streptomyces sp.* QG-11-3. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16 (2), 211-213.
- Bell, J. M. (1984). Nutrients and toxicants in rapeseed meal: A review. *J. animal Sci.*, 58 (4), 996-1010.
- Bell, J. M., Hickling, D. (2001). Section II: Composition of canola meal. In *Canola feed meal industry guide*. Ressource internet: <http://www.canola-council.org/pubs/composit.html>
- Be Miller, J. N. (1986). An introduction to pectins: structure and properties. In *Chemistry and Functions of Pectins*, M. L. Fishman, J. J. Jems (Eds), ACS Symposium Series 310, ACS, Washington DC, 3-11.
- Bernardini, E. (1973). Processing of oilseeds: Rapeseed. In *The new oil and fat technology*, Bernardini E. (Ed.), Technologie, Rome, Part II, 73.
- Bhosle, B. M., Subramanian, R. (2005). New approaches in deacidification of edible oils - a review. *J. Food Eng.*, 69, 481-494.
- Binks, B. P., Cho, W. G., Fletcher, P. D. I. and Petsev, D. N. (2000). Stability of oil-in-water emulsions in a low interfacial tension system. *Langmuir*, 16, 1025-1034.
- Blanco, P., Sieiro, C., Villa, T. G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 175 (1), 1-9.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.
- Bocevaska, M., Karlovic, D., Turkulov, J., Pericin, D. (1993). Quality of corn germ oil obtained by aqueous enzymatic extraction. *J.A.O.C.S.*, 70, 1273-1277.
- Boncheva, M., Vogel, H. (1997). Formation of stable polypeptide monolayers at interface: controlling molecular conformation and orientation. *Biophys. J.*, 73, 1056-1072.
- Bos, M. A., Vliet, T. V. (2001). Interfacial, rheological properties of adsorbed proteins layers and surfactants: A review. *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 91, 437-471.
- Bougnoux, P., de Poncheville, L., Germain, E., Cognault, S., Montharu, J. Aubourg, L., Bonnet, P., Chajès, V. (2000). Augmentation sélective de la sensibilité des tumeurs à la chimiothérapie par les acides gras polyinsaturés n-3. *J. Food Sci.*, 54, 569-572.
- Bourre, J. M., Faivre, A., Dumont, O., Nouvelot, A., Loudes, C., Puymirat, J., Tixier-Vidal, A. (1983). Effect of polyunsaturated fatty acids on fetal mouse brain cells in culture in a chemically defined medium. *J. Neurochem.*, 41, 1234-1242.
- Bourre, J. M., Pascal, G., Durand, G., Masson, M., Dumont, O., Piciotti, M. (1984). Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoided of (n-3) fatty acids. *J. Neurochem.*, 43, 342-348.
- Bourre, J. M., François, M., Youyou, A., Dumont, O., Piciotti, M., Pascal, G., Durand, G. (1989). The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning task in rat. *J Nutr.*, 119 (12), 1880-1892.
- Bourre, J. M. (2003). Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during aging. *J. Nutr. Health Aging*, 8, 163-174.
- Bourre, J. M. (2005). Acides gras oméga-3 et troubles psychiatriques. *Med. Sci.*, 21, 216-221.

- Bruhlmann, F. (1995). Purification and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amycolata* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (10), 3580-3585.
- Buenrostro, M., Lopez-Mungia, C. A. (1986). Enzymatic extraction of avocado oil. *Biotechnol. Lett.*, 8 (7), 505-506.
- Cameron, D. R., Weber, M. E., Idziak, E. S., Neufeld, R. J., Cooper, D. G. (1991). Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: Correction of the formula for emulsifying activity index. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 655-659.
- Carpita, N., McCann, M. (2000) *In Biochemistry and molecular biology of plants*. B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones (Eds), American Society of Plant physiologists, Rockville, Maryland, 52-108.
- Carr, R. A. (1997). Oilseeds processing. *In Technology and solvents for extracting oilseeds and nonpetroleum oils*. Wan P.J., Wakelin P.J. (Eds), AOCS Press, Champaign (USA), 101-120.
- Carrie, I., Guesnet, P., Bourre J. M., Frances, H. (2000). Diets containing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids affect behaviour differently during development than ageing in mice. *Br. J. Nutr.*, 83, 439-447.
- Champolivier, J. (2002). Colza génétiquement modifié. Où en est-on ? *Oléoscope*, 65, 9-27.
- Cheah, S. C., Augustin, M. A., Ooi, L. C. L. (1990). Enzymatic extraction of palm oil. *Palm Oil Res. Bull. Malaysia Bull.*, 20, 30-36.
- Chen, J., Dickinson, E. (1998). Viscoelastic properties of protein-stabilized emulsions: effects of protein-surfactant interactions. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 91-97.
- Chen, P., Policova, Z., Pace-Asciak, C. R., Neumann, A. W. (1999). Study of molecular interactions between lipids and proteins using dynamic surface tension measurements: A review. *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, 15, 313-324.
- Cho, S. Y., Kwon, T. W., Yoon, S. H. (1990). Selective removal of free fatty acids in oils using a microorganism. *J.A.O.C.S.*, 67, 558-560.
- Christensen, F. M. (1989). Enzyme technology versus engineering technology in the food industry. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 11, 249-265.
- Chu, Y. H., Hwang, L. S. (2002). Food lipids. *In Chemical and functional properties of food components*. Z. E. Zikorski, S. E. Zikorski (Eds), CRC Press, Boca Raton, USA, 115-132.
- Clark, D. C., Coke, M., Mackie, A. R., Pinder, A. C., Wilson, B. (1990). Molecular diffusion and thickness measurements of protein stabilized thin liquid films. *J. coll. Interf. Sci.*, 138, 207-219.
- Clausen, K. (2001). Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103 (6), 330-340.
- Clausse, D., Gomez, F., Pezron, I., Komunjer, L., Dalmazzone, C. (2005). Morphology characterization of emulsions by differential scanning calorimetry. *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 117, 59-74.
- Čmolík, J., Pokorný, J. (2000). Physical refining of edible oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102, 472-486.
- Čmolík, J., Schwarz, W., Svoboda, Z., Pokorný, J., Reblova, Z., Dolezal, M, Valentova, H. (2000). Effects of plant-scale alkali refining and physical refining on the quality of rapeseed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102, 15-22.
- Coke, M., Wilde, P. J., Russel, E. J., Clark, D. C. (1990). The influence of surface composition and molecular diffusion on the stability of foams formed from proteins/surfactant mixtures. *J. Coll. Interf. Sci.*, 138, 489-504.
- Combe N., Boué C. (2001). Apports alimentaires en acides linoléique et alpha-linolénique d'une population d'Aquitaine. *OCL*, 8 (2), 118-121.

- Cowan, D. (1983). Proteins. In *Industrial Enzymology*. The application of enzymes in industry. T. Godfrey, J. Reichelt (Eds.), The Nature Press, New-York.
- Cramp, G. L., Docking, A. M., Ghosh, S., Coupland, J. N. (2004). On the stability of oil-in-water emulsions to freezing. *Food Hydrocol.*, 18, 899–905.
- Dahlke, K. (1999). An Enzymatic Process for the Physical Refining of Seed Oil. *Chemic. Eng. Technol.*, 21(3), 278-281.
- Dalgleish, D.G. (2003). In *Food emulsions*, 4^{ième} édition, Friberg, S., Larsson, K., Sjöblom, J. (Eds), Marcel Dekker, New-york, *Chapitre 1: Food emulsions: Their structure and properties*, pp 1-44.
- Das, K. P., Kinsella, J. E. (1990). Stability of food emulsions physicochemical role of protein and non protein emulsifiers. In *Advances in food and nutrition research*, New York, Academic Press, 34, 81-201.
- DeGrado, W. F., Lear, J. D. (1985). Introduction to peptide conformation at apolar / water interfaces. 1: A study with model peptides of defined hydrophobic periodicity. *J.A.O.C.S.*, 107, 7684-7689.
- Delbeke, K., Teklemariam, T., de la Cruz, E., Sorgeloos, P. (1995). Reducing the variability in pollution data: the use of lipid classes for normalization of pollution data in marine data. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 52, 147-162.
- Delonca, H., Passet, J. (1973). Méthodes utilisées pour déterminer le sens et la stabilité d'une émulsion. *Labo-Pharma-problèmes et Techniques*, 224, 97-102.
- Deng, Y., Pyle, D. L., Niranjan, K. (1992). Studies of aqueous enzymatic extraction of oil from rapeseed. *Agri. Eng. Rural Dev. I: Conf. Proc.*, Zhang W., Giro P.W., Zhang S.W. (Eds). International Academic Publishers. Beijing, 190-195.
- Denise, J. (1998). Recent trends in oilseed processing. *OCL*, 5(5), 354-355.
- Denkova, P. S., Tcholakova, S., Denkov, N. D., Danov, K. D., Campbell, B., Shawl, C., Kim, D. (2004). Evaluation of the precision of drop-size determination in oil/water emulsions by low-resolution NMR spectroscopy. *Langmuir*, 20, 11402-11413.
- DeParis, V, Durrieu, C., Schweizer, M., Marc, I., Goergen, J. L., Chevalot, I., Marc, A. (2003). Promoting effect of rapeseed proteins and peptides on Sf9 insect cell growth. *Cytotechnol.*, 42, 75–85.
- Derjaguin, B., Landau, L. (1941). Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physica et Chimica*, 14 (6), 633–662.
- De Vleeschauwer, D., Van der Meeren, G. (1999). Colloid chemical stability and interfacial properties of mixed phospholipid-non-ionic surfactant stabilised oil in water emulsions. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 152, 59-66.
- Dewulf, J., Van Langenhove, H., Van De Velde, B. (2005). Exergy-based efficiency and renewability assessment of biofuel production. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39 (10), 3878–3882.
- Dickinson, E., Stainby, G. (1982). In *Colloids in foods*, Applied Sci. Publishers, London.
- Dickinson, E. (1989). A model of a concentrated dispersion exhibiting bridging flocculation and depletion flocculation. *J. Coll. Interface Sci.*, 132 (1), 274-278.
- Dickinson, E. (1992a). In *An introduction to food emulsions*. Oxford University Press, Oxford, UK. Short-range structure of simulated flocs of particles with bridging polymer. *Coll. Surf.*, 62 (3), 231-242.
- Dickinson, E. (1992b). Structure and composition of adsorbed protein layers and relationships to emulsion stability. *J. Chem. Soc. Faraday Disc.*, 88, 2973-2983.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems, *Food Hydrocolloids*, 17 (1), 25-39.

- Dimitrova, T. D., Leal-Calderon, F. (2004). Rheological properties of highly concentrated protein-stabilized emulsions. *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 108-109, 49-61.
- Diosady, L. L., Sleggs, P. W., Kaji, T. (1984). Scale up of canola oil degumming. *J.A.O.C.S.*, 61 (8), 1366-1369.
- Domínguez, H., Núñez, M. J., Lema, M. J. (1994). Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: A review. *Food Chem.*, 49 (3), 271-286.
- Domínguez, H., Núñez, M. J., Lema, M. J. (1995). Aqueous processing of sunflower kernels with enzymatic technology. *Food Chem.*, 53, 427-434.
- Dosanjh, N. S., Hoondal, G. S. (1996). Production of constitutive, thermostable, hyper active exo- pectinase from Bacillus GK-8. *Biotechnol. Lett.*, 18 (12), 1435-1438.
- Dukhin, S., Sjoblom, J. (1996). Kinetics of Brownian and gravitational coagulation in dilute emulsions. *In Emulsion and emulsion stability*, Sjoblom J. (Ed.), Marcel Dekker, New-York, Chapitre 8, 41-180.
- Einhorn-Stoll, U. Weiss, M., Kunsek H. (2002). Influence of the emulsion components and preparation method on the laboratory-scale preparation of o/w emulsions containing different types of dispersed phases and/or emulsifiers. *Nahrung/Food*, 46 (4), 294-301.
- Embong, M.B., Jelen, P. (1977). Technical feasibility of aqueous extraction of oil: A laboratory study. *J. Can Inst. Food Sci. Technol.*, 10, 239-243.
- Eow, J. S., Ghadiri, M., Sharif, A. O., Williams, T. J. (2001). Electrostatic enhancement of coalescence of water droplets in oil: A review of the current understanding. (2001). *Chem. Eng. J.*, 84, 173-192.
- Eskin, N. A. M., McDonald, B. E., Przybylski, R., Malcolmson, L. J., Scarth, R., Mag, T., Ward, D., Adolph, D. (1996) Canola oil. *In Industrial Oil & Fat Products*, Y. H. Hui (ed.), Bailey's, Fifth Edition Volume 2, Oils and Oilseeds, John Wiley & Sons, Inc., 1-95.
- Evrard, J. (2003). Proteins and lipids: Technologies for present and future use [Protéines et lipides: Des technologies adaptées aux usages actuels et futurs]. *OCL*, 10 (1), 57-60.
- Fantozzi, P., Petruccioli, G., Montedoro, G. (1977). Enzymatic treatment of olive pastes after single pressing extraction. Effect of cultivar, Harvesting time, and storage. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 54, 381-388.
- Fairbanks, H. V. (2001). Drying powdered coal with the aid of ultrasound. *Powder Technol.*, 40 (1-3), 257-264.
- Fédiol (2005). Données statistiques mondiales de 2005.
Ressources internet : <http://www.fediol.be/6/index2.php>.
- Fen Nema, O. R. (1996). *In Food chemistry*, 3^{ième} ed., Marcel Dekker, New-York.
- Fenwick, R. G., Heaney, R. K., Mullin, W. J. (1983). Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 18, 123 -201.
- Fiechter, A. (1992) Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.*, 10, 208-217.
- Firestone, E., Fedeli, E., Emmons, E. W. (1996) Olive oil. *In Industrial Oil & Fat Products*, Y. H. Hui (ed.), Bailey's, Fifth Edition Volume 2, Oils and Oilseeds, John Wiley & Sons, Inc., 241-270.
- Fontes, S. R., Quieroz, V. M., Longo, E., Antunes, M. V. (2005). Tubular microporous alumina structure for demulsifying vegetable oil/water emulsions and concentrating macromolecular suspensions. *Sep. purif. technol.*, 44 (3), 235-241.

- Frances, H., Draï, P., Smirnova, M., Carrie, I., Debray, M., Bourre J. M. (2000). Nutritional (n-3) polyunsaturated fatty acids influence the behavioral responses to positive events in mice. *Neurosci. Lett.*, 285, 223-227.
- Freitas, S. P., Lago, R. C. A., Jablonka, F. H., Hartman, L. (1993). Aqueous enzymatic extraction of avocado oil from fresh pulp. *Rev. Franç. des Corps Gras*, 40, 365-371.
- Food Chemicals Codex (2004). 5^{ième} Ed., The National Academies Press, Washington, D. C.
- Fullbrook, P. D. (1983). The use of enzymes in the processing of oilseeds. *J.A.O.C.S.*, 60, 476-479.
- Galazka, V. B., Dickinson, E., Ledward, D. A. (2000). Emulsifying properties of ovalbumin in mixtures with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength, heat and high-pressure treatment, *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1219-1229.
- Galazka, V. B., Dickinson, E., Ledward, D. A. (2000). Influence of high pressure processing on protein solutions and emulsions. *Current Opinion Coll. Interf. Sci.*, 5, 182-187.
- Galvin, J. B. (1997). Toxicity data for commercial hexane and hexane isomers. In *Technology and solvents for extracting oilseeds and nonpetroleum oils*. Wan P. J., Wakelyn P. J. (Eds), AOCS press, Champaign (USA), 75-85.
- Geigenberger, P. (2003). Response of plant metabolism to too little oxygen. *Cur. Opinion Plant Biol.*, 6 (3), 247-256.
- Ghosh, S., Cramp, G. L., Coupland, J. N. (2006). Effect of aqueous composition on the freeze-thaw stability of emulsions. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 272, 82-88.
- Gibon, V., Tirtiaux, A. (1998). Un raffinage S.O.F.T.[®]. *OCL*, 5 (5), 371-377.
- Gill, T. A., Tung, M. A. (1978). Chemistry and ultrastructure of a major aleurone protein of rapeseed meal. *Cereal. Chem.*, 55, 180-188.
- González-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Páez, M. P., Guadix, E. M. (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 523-528.
- Guéguen, J., Azanza, J. L. (1985). Propriétés biochimiques et physicochimiques des protéines végétales. A-Composition et propriétés physicochimiques des protéines de légumineuses et d'oléagineux. In *Protéines végétales*, Lavoisier (Eds), pp 135-159.
- Gummadi, S. N., Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases - A review. *Process Biochem.*, 38 (7), 987-996.
- Gunetileke, K. G., Laurentius, S. F. (1974). Conditions for the separation of oil and protein from coconut skim emulsion. *J. Food Sci.*, 39, 230-233.
- Gunstone, F. D. (2001). Procedures used for lipid modifications. In *Structured and modified lipids*, Gunstone F.D. (Ed.), Marcel Dekker, New-York, pp 11-36.
- Grant, D. R., Eager, R. L., Pepper, J. M. (1983). Factors affecting the desolventization of canola meal. *J.A.O.C.S.*, 60 (11), 1867-1875.
- Hafidi, A., Pioch, D., Ajana, H. (2005). Membrane-based degumming and deacidification of vegetable oils. *Innovative Food Sci. and Emerging Technol.*, 6, 203-212.
- Hagenmaier, R. D., Cater, C. M., Mattil, K. F. (1972). Critical unit operations of the aqueous processing of fresh coconuts. *J.A.O.C.S.*, 49, 178-181.
- Hagenmaier, R. D., Cater, C. M., Mattil, K. F. (1973). Aqueous processing of fresh coconuts for recovery of oil. *J. Food Sci.*, 38, 516-518.

- Hanmoungjai, P., Pyle, D. L., Niranjana, K. (2001). Enzymatic process for extracting oil and protein from rice bran. *J.A.O.C.S.*, 78, 817-821.
- Hefter, G. (Ed.) (1905). *In Technologie der Oele und Fette -I-. J. Springer*, Berlin, 654.
- Hemar, Y., Hoeme, D. S. (2000). Dynamic rheological properties of highly concentrated protein-stabilized emulsions. *Langmuir*, 16, 3050-3057.
- Hiemenz, P. C. (1986). *In Principles of colloid and surface chemistry*, Dekker, New York, 646.
- Ho, C. C., Chow, M. C. (2002). *In Encyclopedia of Surface and Colloidal Science*, T. Arthur (Ed.), Chap: Edible Emulsions, Santa Barbara Science Project, USA, pp 1561-1571.
- Hoondal, G. S., Tiwari, R. P., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q. K. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59 (4-5), 409-418.
- Hron, R. J., Kuk, M. S., Abraham, G., Wan, P. J. (1994). Ethanol extraction of oil, gossypol and aflatoxin from cottonseed. *J.A.O.C.S.*, 71 (4), 417-421.
- Hron, R. J. (1997). Acetone. *In Technology and solvents for extracting oilseeds and nonpetroleum oil*. Wan P. J., Wakelyn P. J. (Eds), AOCS press, Champaign (USA), pp 186-191.
- Hruschka, S., Frische, R. (1998). A new oil extraction process: FRIOLEX®. *OCL*, 5 (5), 356-360.
- Huang, A. H. C. (1996). Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.*, 110, 1055-1061.
- Huang, L. K., Mahoney, R. R. (1999). Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *J. Appl. Microbiol.*, 86 (1), 145-156.
- Hulshof, K., Van Erp-Baart, M. A., Anttolainen, M., Becker, W., Church, S. M., Couet, C., Hermann-Kunz, E., Kesteloot, H., Leth T., Martins, I., Moreiras, O., Moschandreas, J., Pizzoferrato, L., Rimestad, A. H., Thorgeirsdottir, H., van Amelsvoort, J. M. M., Aro, A., Kafatos, A. G., Lanzmann-Petithory, D., van Poppel, G. (1999). Intake of fatty acids in Western Europe with emphasis on trans fatty acids: the TRANSFAIR study. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 53, 143-157.
- Hlavacek, M. (1995). Break-up of oil-in-water emulsions induced by permeation through a microfiltration membrane. *J. Memb. Sci.*, 102, 1-7.
- Ichikawa T., Nakajima Y. (2004a). Rapid demulsification of dense oil-in-water emulsion by low external electric field. II. Theory. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 242 (1-3), 27-37.
- Ichikawa, T., Itoh, K., Yamamoto, S., Sumita, M. (2004b). Rapid demulsification of dense oil-in-water emulsion by low external electric field: I. Experimental evidence. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 242 (1-3), 21-26.
- INFORM (2002). Isohexane: Likely choice for crushers seeking to replace n-hexane. *Inform*, 13(4), 282-286.
- Israelachvili, J. N. (1992). *Intermolecular and surface forces*, 2nd edition, Academic Press, San Diego.
- Jacobsen, C. F., Léonis, J., Linderstrom-Lang K., Ottesen, M. (1957). *In Method of biochemical analysis*. D. Glick (Ed), Interscience Publ. Inc, New-York, Chap 4, 187-202.
- Johnson, L. A., Lusas, E. W. (1983). Comparison of alternative solvents for oils extraction. *J.A.O.C.S.*, 60, 229-242.
- Johnson, L. A. (2002). Recovery, refining, converting, and stabilizing edible fats and oils. *In Food lipids, part II: processing*, C. C. Akoh, D. B. Min, A.C. Akoh (Eds), Marcel Dekker, New-York, 223-274.
- Kabalnov, A., Arlauskas, R., Weers, J., Tarara, T. (1995). Phospholipids as emulsions stabilizers. 1. Interfacial tensions. *Langmuir*, 11, 2966-2975.

- Kabalnov, A., Tarara, T., Arlauskas, R., Weers, J. (1996). Phospholipids as emulsions stabilizers. 2. Phase behaviour versus emulsion stability. *J. Coll. and Interf. Sci.*, 184, 227-235.
- Kang, W., Jing, G., Zhang, H., Li, M., Wu, Z. (2006). Influence of demulsifier on interfacial film between oil and water. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 272, 27-31.
- Kashyap, D. R., Chandra, S., Kaul, Tewari, A. (2000). Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus sp.* DT7. *World J. Microbiol. Biotech.*, 16 (3), 277-282.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., Tewari, A. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technol.*, 77, 215-227.
- Kapoor, M., Beg, Q. K., Bhushan, B., Dadhich, K. S., Hoondal, G. S. (2000). Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus sp.* MG-cp-2. *Process Biochem.*, 36 (5), 467-473.
- Kato, A., Fujishige, T., Matsudomi, N., Kobayashi, K. (1985). Determination of emulsifying properties of some proteins by conductivity measurements. *J. Food Sci.*, 50, 56-58.
- Kelley, S. (1996). Dietary fat and human immune response. *Inform*, 7, 852-857.
- Kelley, C. (2005). A novel procedure for fat and oil extraction. *Inform*, 16 (2), 76-77.
- Kim, H. J., Decker, E. A., McClements, D. J. (2002). Role of post-adsorption conformation changes of beta-lactoglobulin on its ability to stabilize oil droplets against flocculation during heating at neutral pH. *Langmuir*, 18, 7577-7583.
- King, J. W. (1997). Critical fluids for oil extraction. In *Technology and solvents for extracting oilseeds and nonpetroleum oils*. Wan P.J., Wakelyn P.J. (Eds), AOCS press, Champaign (USA), 283-310.
- Kiokias, S., Reiffers-Magnani, C. K., Bot, A. (2004). Stability of Whey-Protein-Stabilized Oil-in-Water Emulsions during Chilled Storage and Temperature Cycling. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 12, 3823-3830.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D. U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends Food Sci. Technol.*, 15, 261-266.
- Kodas, E., Vancassel, S., Lejeune, B., Guilloteau, D., Chalou, S. (2002). Reversibility of n-3 fatty acid deficiency induced changes in dopaminergic neurotransmission in rats: critical role of developmental stage. *J. Lipid Res.*, 43, 1209-1219.
- Kohno-Murase, J., Murase, M., Ichikawa, H., Imamura, J. (1995). Improvement in the quality of seed storage protein by transformation of *Brassica napus* with an antisense gene for cruciferin. *TAG Theoretical and Applied Genetics* (Historical Archive), 91(4), 627-631.
- Kohlmann, K. M., Westgate, P., Velayudhan, A., Weil, J., Sarikaya, A., Brewer, A., Hendrickson, R. L., Ladisch, M. R. (1996). Enzyme conversion of lignocellulosic plant materials for resource recovery in a controlled ecological life support system. *Adv. Space Res.*, 18 (1/2), 251-265.
- Komatsu, H., Okada, S., Handa, T. (1997). Suppressive effects of salts on droplet coalescence in a commercially available fat emulsion during freezing for storage. *J. Pharm. Sci.* 86 (4), 497-502.
- Konovalova, I. N., Stepanova, N. V., Vasilevskii, P. B., Bereza, I. G. (2001). Intensification of the flotation treatment of water with natural polyelectrolytes. *Russian J. of applied Chem.*, 74 (3), 449-454.
- Koris, A., Vatai, G. (2002). Dry degumming of vegetable oils by membrane filtration. *Desalination*, 148, 149-153.
- Kovári, K. (2004). Recent developments, new trends in seed crushing and oil refining. *OCL*, 11 (6), 381-387.
- Kramer, J. K. G., Hulan, H. W., Mahadevan, S., Sauer, F. D., Corner, A. H. (1977). Nutritional evaluation of rapeseed oil: a review. In *Rapeseed Oil, Meal and Byproduct utilization*. Proc. of a Symp., March 1977, 22-23.

- Kremer, J. M. (2000). N-3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71 (S), 349-351.
- Kuang, A., Xiao, Y., McClure, G., Musgrave, M. E. (2000). Influence of microgravity and storage reserves in seeds of *Brassica rapa* L.. *Annals of Botany*, 85, 851-859.
- Krause, J. P., Schwenke, K. D. (2001). Behaviour of a protein isolate from rapeseed (*Brassica napus*) and its main protein components – globulin and albumin – at air/solution and solid interfaces, and in emulsions. *Coll. and surfaces B: Biointerfaces*, 21, 29-36.
- Lanzani, A., Petrini, L. C., Cozzoli, O., Gallavresi, P. Carola, C., Jacini, G. (1975). On the use of enzymes for vegetable-oil extraction. *La Riv. Ita. Delle Sostan. Gra.*, 52, 226-229.
- Lanzani, A., Bondioli, P., Brillo, A., Cardillo, M., Fedeli, E., Ponzetti, A., Pieralisi, G. (1991). Wet process technology applied to jojoba seed to obtain oil and detoxified protein meal. *J.A.O.C.S.*, 68 (10), 772-774.
- Latreille, B., Paquin, P. (1990). Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. *J. Food Sci.*, 55, 1666–1668.
- Lemarié, J., De Looze, M. A., Rivaud, D. (1996). Protéines du colza : quels usages industriels ? *Oléoscope*, 36, 9-18.
- Lenman, M., Falk, A., Rödin, J., Höglund, A. S., Ek, B., Rask, L. (1993). Differential expression of myrosinase gene families. *Plant Physiol.*, 103, 703-711.
- Lepage, G., Roy, C. C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.*, 27 (1), 114-120.
- Leprince, O., Van Aelst, A. C., Pritchard, H. W., Murphy, D. J. (1998). Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by low-temperature scanning electron microscope study of desiccation -tolerant and -sensitive oilseeds. *Planta*, 204, 109-119.
- Lettow, J. S., Lancaster, T. M., Glinka, C. J. et Ying, J. Y. (2005). Small-angle neutron scattering and theoretical investigation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) stabilized oil-in-water microemulsions. *Langmuir*, 21, 5738-5746.
- Li, H., Pordesimo, L., Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction oil from soybean. *Food Res. Internat.*, 37, 731-738.
- Li, M., Smith, J., Clark, D. C., Wilson, R., Murphy, D. J. (1992). Secondary structures of a new class of lipid body proteins from oilseeds. *J. Biol. Chem.*, 267 (12), 8245-8253.
- Li, M., Murphy, D. J., Smith, J., Lee, K. H. K., Wilson, R., Smith, L. J., Clark, D. C. , Sung, J. Y. (2002). Purification and structural characterization of the central hydrophobic domain of oleosin. *J. Biol. Chem.*, 277 (40), 37888-37895.
- Lien, T. R., Phillips, C. R. (1974). Determination of particle size distribution of oil-in-water emulsions by electronic counting. *Environm. Sci. Technol.*, 8 (6), 558-561.
- Linarès, E., Larré, C., Popineau, Y. (2001). Freeze- or spray-dried glutenhydrolysates. 2. Effect of emulsification process on droplet size and emulsion stability. *J. Food Eng.*, 48, 137-146.
- Linder, M., Parmentier, M., Sergent, M., Phan-Tan-Luu, R. (1995). Application de la méthode des surfaces de réponse à l'optimisation d'un procédé d'extraction enzymatique de sous produits d'abattage. *Recents progrès en Génie des Procédés*, 36 (9), 55-60.
- Linder, M. (1996). Optimisation d'un procédé de vaporisation de co-produits d'abattage par hydrolyse enzymatique. Propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des hydrolysats. Thèse de L'INPL.

- Lips, A., Westbury, T., Hart, P.M., Evans, I. D., Campbell, I. J. (1993). Aggregation mechanisms in food colloids and the role of biopolymers. In *Food Colloids and polymers: stability and mechanical properties*. Dickinson E., Walstra P. (Eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 31-44.
- Lu, G. Y., Yang, G. S., Fu, T. D. (2004). Molecular mapping of a dominant genic male sterility gene Ms in rapeseed (*Brassica napus*). *Plant Breed.*, 123 (3), 262-265.
- Luque-García, J. L., Luque de Castro, M. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (1), 41-47.
- Lusas, E. W., Hernandez, E. (1997). Isopropyl alcohol. In *Technology and solvents for extracting oilseeds and nonpetroleum oils*. Wan P. J., Wakelyn P. J. (Eds), A.O.C.S. press, Champaign (USA), 199-266.
- Mackie, A. R., Gunning, P. A., Wilde, P. J., Morris, R. J. (2000a). Competitive displacement of β lactoglobuline from the air/water interface by sodium dodecyl sulfate. *Langmuir*, 16, 8176-8181.
- Mackie, A. R., Gunning, P. A., Wilde, P. J., Morris, R. J. (2000b). Orogenic displacement of protein from the oil/water interface. *Langmuir*, 16, 2242-2247.
- Mac Glone, O. C., Canales A. L. M., Carter, J. V. (1986). Coconut oil extraction by a new enzymatic process. *J. Food Sci.*, 51 (3), 695-697.
- Mac Richtie, F. (1998). Reversibility of protein adsorption. In *Proteins at liquid interface*, Möbius D., Miller R. (Eds), Elsevier, Amsterdam, pp 149-177.
- Mag, T. K. (1983). Canola oil processing in Canada. *J.A.O.C.S.*, 60 (2), 380-384.
- Mag, T. K. (1990). Further processing of canola and rapeseed oils. In *Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition, and processing technology*, Chp 15, F. Shahidi (Ed.), Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 251-276.
- Manirakiza, P., Covaci, A., Schepens, P. (2001). Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh and Dyer, and modified Bligh and Dyer extraction methods. *J. Food Composit. Analys.*, 14, 93-100.
- Marczak, E. D., Usui, H., Fujita, H., Yang, Y., Yokoo, M., Lipkowski, A. W., Yoshikawa, M. (2003). New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides*, 24 (6), 791-798.
- Margot, A., Flaschel, E., Renken, A. (1997). Empirical kinetic models for tryptic whey protein hydrolysis. *Process Biochem.*, 32 (3), 217-223.
- Martin, A. (2001). Apports nutritionnels conseillés pour la population française. In 3^{ème} ed., *Cnera-Afssa*. Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 605.
- Martin, A. H., Bos, M., Cohen Stuart, M., Van vliet, T. (2002a). Interfacial rheological properties and conformational aspects of soy glycinin at the air/water interface. *Food hydrocoll.*, 16, 63-71.
- Martin, A. H., Bos, M., Cohen Stuart, M., Van Vliet, T. (2002b). Stress –strain curves of adsorbed protein layers at the air/water interface measured with surface shear rheology. *Langmuir*, 18, 1238-1243.
- Martin, A. H., Meinders, M. B. J., Bos, M. A., Cohen Stuart, M. A., Van Vliet, T. (2003). Conformational changes of proteins at the air water interface studied by IRRAS. *Langmuir*, 19, 2922-2928.
- Martini, M. C., Seiller, M. (1999). Actif et additifs en cosmétologie. In 2nd ed. Lavoisier, *Tec & Doc*, Paris, 240-244.
- Marquez Moreno, M. C., Fernandez Cuadrado, V. (1993). Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochem.*, 1993, 28, 481-490.
- Masmoudi, H., Le Dréau, E. Y., Piccerelle, P., Kister, J. (2005). The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int. J. Pharmaceutics*, 289, 117-131.

- Mason, T., Lorimer, J. (1988). Sonochemistry: Theory, applications and uses in food technology. *In Chichester: Ellis Horwood Limited*, 42-47.
- Mason, T.J., Paniwnika, L., Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics sonochemistry*, 3 (3), 253-260.
- Mathieu, D., Phan-Tan-Luu, R. (1992). Laboratoire de prospective Réactionnelle et d'analyse de l'Information (LPRAI). Université Aix-Marseille. Nemrod®: New efficient methodology for research using optimal design.
- Mc Clements, D. J. (1999). *In Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. CRC Press. Boca Raton, FL, 20-197.
- Mc Clements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Curr. Opinion Coll. Interf. Sci.*, 9, 305-313.
- Mc Kevith, B. (2005). Nutritional aspects of oilseeds. *British Nutrition Foundation, Nutrition Bulletin*, 30, 13-26.
- Menendez, J. A., Vellon, L., Colomer, R., Lupu, R. (2005). Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/*neu* (*erbB-2*) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin™) in breast cancer cells with Her-2/*neu* oncogene amplification. *Ann. Oncol.* 16, 359-371.
- Menon, V. P. et Wasan, D. T. (1985). Demulsification. *In Encyclopedia of Emulsion Technology*, P Becherred (Ed.), Marcel Dekker, New York, vol. 2, pp 1-75.
- Ministère de l'agriculture anglais (1998). Fatty Acids. *In The composition of food*, 7^{ième} supp. 5^{ième} Ed., McCance & Widdowson's (Eds), The royal society of chemistry and the ministry of agriculture, fisheries and food, London.
- Mohamed Salleh, M. R., Maruyama, N., Adachi, M., Hontani, N., Saka, S., Kato, N., Ohkawa, Y., Utsumi, S. (2002). Comparison of protein chemical and physicochemical properties of rapeseed cruciferin with those of soybean glycinin. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (25), 7380-7385.
- Mothadi-Nia, D. J., Bau, H. M., Giannangeli, F., Mejean, L., Debry, G. (1986). Valorisation nutritionnelle des protéines de colza par un traitement hydro-thermique des graines. *Can. Inst. Food Sci. Technol.*, 19, 95-103.
- Mustakas, G. C. (1980). Recovery of oil from soybeans. *In Handbook of soy oil processing and utilization*, Erickson, D. R. (Ed.), American Soybean Association and American Oil Chemists' Society, St.Louis, 49-65.
- Nakamura, A., Maeda, H., Corredig, M. (2004). Competitive adsorption of soy soluble polysaccharides in oil-in-water emulsions. *Food Res. Int.*, 37, 823-831.
- Nilsson-Johansson, L., Brimberg, U., Haraldsson, G. (1988). Experience of prerefining of vegetable oils with acids. *Fat Sci. Technol.*, 90 (11), 447-451.
- Niewiadomski, H. (1990). *In Rapeseed. Chemistry and technology*. Amsterdam, Netherlands, Elsevier applied Science, 1-433.
- O'Brien, R. D., O'Brien O. D. (Eds) (2003). *In Fats and oils formulating and processing for application*. 2^{nde} édition, CRC Press, New-York, 616.
- Ohlson, R. (1992). Modern processing of rapeseed. *J.A.O.C.S.*, 69, 195-198.
- Oliveira, R. C. G., Gonzalez, G., Oliveira, J. F. (1999). Interfacial studies on dissolved gas flotation of oil droplets for water purification. *Coll. and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 154,127-135.
- Olsen, H. S. (1988). Aqueous extraction of oil from seeds. *In Asian food conference*. Bangkok, Thaïland, 24-26.

- Olsen, H.S.(1994). Aqueous Enzymatic Extraction of Oil from Rapeseeds. Manufacture of food and beverage 14. Ressource internet: <http://www.p2pays.org/ref/10/09365.htm>.
- O'Meara, G. M., Munro, P. A. (1985). Kinetics of the hydrolysis of lean meat protein by alcalase: derivation of two alternative rate equations and their fit to experimental data. *Biotechnol. Bioeng.*, (27) 861-869.
- Oniol (2005). Conseil de direction du 16/11/2005.
- Osagie, A. U., Kates, M. (1984). Lipid composition of Millet (*Pennisetum americanum*) seeds. *Lipids*, 19 (12), 958-965.
- Palanuwech, J., Coupland, J. N. (2003). Effect of surfactant type on the stability of oil-in-water emulsions to dispersed phase crystallization, *Coll. Surf. A*, 223, 251-262.
- Pan, L. G., Tomás, M. C., Añón, M. C. (2004). Oil-in-water emulsions formulated with sunflower lecithins: Vesicle formation and stability. *J.A.O.C.S.*, 81 (3), 241-244.
- Panyam, D., Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 120-125.
- Parmenter, D. L., Boothe, J. G., Rooijen, G.J.H., Yeung, E. C., Moloney, M. M. (1995). Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Mol. Biol. (Historical Archive)*, 29(6), 1167 – 1180.
- Pearce, K.N., Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 716–723.
- Pedersen, B., Eggum, B. O. (1983). The influence of milling on the nutritive value of flour from cereal grains. IV. Rice. *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.*, 33: 267-278.
- Pekrun, C., Lutman, P. J. W., Baeumer, K. (1997). Induction of secondary dormancy in rape seeds (*Brassica napus* L.) by prolonged imbibition under conditions of water stress or oxygen deficiency in darkness. *Eur. J. Agron.*, 6 (3-4), 245-255.
- Perrut, M. (1999). Le fractionnement des corps gras par fluide supercritique. *OCL*, 6 (3), 208-211.
- Pioch, D., Larguèze, C., Graille, J., Ajana, H., Rouvière, J. (1998). Towards an efficient membrane based vegetable oils refining. *Indus. Crops and Products*, 7, 83-89.
- Ponne, C. T., Möller, A. C., Leopold, M. M., Tijskens, L. M. M., Bartels, L. P. V., Meijer, M. M. T. (1996). Influence of microwave and steam heating on lipase activity and microstructure of rapeseed (*Brassica napus*). *J. Agric. Food Chem.*, 44 (9), 2818-2824.
- Pons, R., Solans, C., Tadros, T. F. (1995). Rheological behaviour of highly concentrated oil-in-water (o/w) emulsions. *Langmuir*, 11, 1966-1971.
- Postolache, C., Oncescu, T. (1989). Kinetics of hemoglobin and casein hydrolysis catalyzed by alcalase. *Rev. Roum. Chim.*, 34, 581-584.
- Povey, M. J. W. (1998). Ultrasonics of food. *Contemporary Physics*, 39 (6), 467-478.
- Prakash, V., Rao, M. S. (1986). Physicochemical properties of oilseed proteins. *Critical Rev. Biochem.*, 20 (3), 264-363.
- Proléa et Amsol (2001). Dossier: Point colza 2001.
- Przybylski, R. (2001). Canola oil: Physical and chemical properties. *In canola oil technical information kit*. Ressource internet: <http://www.canola-council.org/pubs/physprop.html>
- Rackov, G. (2004). Brassica, *In Biotechnology in agriculture and forestry*, Pua E., Douglas C. J. (Eds), Springer, Germany, 54, 3-11.

- Rampon, V., Lethuaut, L., Mouhous-Riou, N., Genot C. (2001). Interface characterization and aging of bovine serum albumin stabilized oil-in-water emulsions as revealed by front-surface fluorescence. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4046-4051.
- Rampon, V., Genot, C., Riaublanc, A., Anton, M., Axelos, M. A. V., McClements, D. J. (2003). Front surface fluorescence spectroscopy study of globular proteins in emulsions: influence of droplet flocculation. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (9), 2490-2495.
- Rampon, V., Genot, C., Riaublanc, A., Anton, M., Axelos, M. A. V., McClements, D. J. (2003). Front-face fluorescence spectroscopy study of globular proteins in emulsions: Displacement of BSA by a nonionic surfactant. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (9), 2482-2489.
- Rampon, V., Brossard, C., Mouhous-Riou, N., Bousseau, B., Llamas, G., Genot, C. (2004). The nature of the apolar phase influences the structure of the protein emulsifier in oil-in-water emulsions stabilized by bovine serum albumin. A front surface fluorescence study. *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 108-109, 87-94.
- Ranalli, A., Martellini, N. (1994). Extraction of oil from olive pastes by biological and not conventional industrial techniques. *Industrie Alimentarie*, 33, 1073-1083.
- Rao, K. R., Arnold, R. K. (1956). Alcoholic extraction of vegetable oils. III. Solubilities of babassu, coconut, olive, palm, rapeseed, and sunflower oil in aqueous ethanol. *J.A.O.C.S.*, 33, 389-391.
- Rask, L., Andréasson, E., Ekbo, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., Meijer, J. (2000). Myrosinase: gene family evolution and herbivory defense in *Brassicaceae*. *Plant. Mol. Biol.*, 42, 93-113.
- Robins, M. M., Watson, A. D., Wilde, P. J. (2002). Emulsions-creaming and rheology. *Cur. Opinion Coll. interf. Sci.*, 7, 419-425.
- Rochow, T. G., Mason, C. W. (1936). Breaking emulsions by freezing. *Indus. Eng. Chem.*, 28 (11), 1296-1300.
- Roland, I., Piel, G., Delattre L., Evrard B. (2003). Systematic characterization of oil-in-water emulsions for food design. *Int. J. Pharmaceutics*, 263, 85-94.
- Rosenthal, A., Pyle, D. L., Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic process for edible oil extraction. *Enzyme and Microb. Technol.*, 402-420.
- Roxas, P. G. (1963). Process of recovering oils from oleaginous meats of nuts, beans, and seeds. *United State Patent*: US3083365
- Rozan, P. (1997). Traitements technologiques et prise alimentaire (exemple du tourteau de colza industriel). Faculté des sciences, Thèse Nancy I.
- Ruiz-Mendez, M. V., Marquez-Ruiz, G., Dobarganes, M.C. (1996). Comparative performance of steam and nitrogen stripping gas in physical refining of edible oils. *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 113, 43-63.
- Saadatian, M., Goudable, J., Riboli, E. (1999). Lipides et cancer. *OCL*, (6), 242-252.
- Sado, G., Sado, M. C. (1991). Les plans d'expériences. *In De l'expérimentation à l'assurance qualité*. AFNOR, Chap. 7, 109-123.
- Saito, H., Kawagishi, A., Tanaka, M., Tanimoto, T., Okada, S., Komatsu, H., Handa, T. (1999). Coalescence of lipid emulsions in floating and freeze-thawing processes: Examination of the coalescence transition state theory. *J. Coll. Interf. Sci.*, 219, 129-134.
- Salunkhe, D. K., Chavan, J. K., Adsule, R. N., Kadam, S. S. (1992). *In World oilseeds: chemistry, technology and utilization*. Van Nostrand Reinhold, New-York, 59-96.
- Sánchez-Vioque, R., Bagger, C., Rabiller, C., Guéguen J. (2001). Foaming properties of acylated rapeseed (*Brassica napus* L.) peptides. *J. Coll. interf. Sci.*, 244, 386-393

- Sánchez-Vioque, R., Bagger, C., Larré, C. and Guéguen J. (2004). Emulsifying properties of acylated rapeseed (*Brassica napus* L.) hydrolysates. *J. Coll. interf. Sci.*, 271, 220-226.
- Schneider, M. (1997). Phospholipids. In *Lipids technologies and applications*, F. D. Gunstone, F. D. Padley (Eds), Marcel Dekker : New-York, 51-78.
- Schokker, E. P., Dalgleish, D.G. (1998). The shear-induced destabilization of oil-in-water emulsions using caseinate as emulsifier. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 145 (1), 61-69.
- Schwenke, K. D., Raals, B., Linow, K. J., Pähtz, W., Uhlig, J. (1981). Isolation of 12S Globulin from rapeseed and characterization as a neutral protein. *Die Nahrung*, 25 (3), 271-280.
- Scott, D. (1978). Enzymes, industrial. In *Encyclopedia of chemical technology*, M. Grayson, D. Ekarth, K. Othmer (Eds), New York, Wiley, 173-224.
- Segel, I. H. (1975). *Enzyme Kinetics. A Wiley-Interscience Publication.*
- Segers, J. J., Van de Sande, R. K. L. M. (1982). Superdegumming, a new degumming process and its effect on the effluent problems of edible oil refining. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 84 (1 Sonderheft), 543-546.
- Sen Gupta, A. K. (1977). Procees for refining crude glyceride oils by membrane filtartion. *United State Patent* : US 4 062 882.
- Shah, S., Sharma, A., Gupta, M. N. (2005). Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by combination of ultrasonication and aqueous enzymatic oil extraction. *Bioresource Technol.*, 96 (1), 121-123.
- Shahidi, F., Wanasundara, P. K. J. P. D. (2002). Extraction and analysis of lipids. In *Food lipids: chemistry, nutrition and food technology*. C. C. Akoh, D. B. Min (Eds), Marcel Dekker, New-York, 133-168.
- Shaw, D. J. (1980). In *Introduction to colloid and surface chemistry*, 3^{ième} Ed., Butterworths, London.
- Shchipunov, Yu A. (1996). Phase behavior of lecithin at the oil water interface. *Langmuir*, 12, 6443-6445.
- Shimizu, M., Saito, M. (1996). Lipid-Protein interaction at an emulsified oil surface: protein structures and their role in lipid binding. *ACS Symposium Series*, 650, 156-165.
- Silva, J. L., Weber, G. (1993). Pressure stability of proteins. *Annual Rev. Phys. Chem.*, 44, 89-113.
- Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., Lema, J. M. (1998). Optimization of the enzymatic treatment during aqueous oil extraction from sunflower seeds. *Food Chem.*, 61 (4), 467-474.
- Skauen, D. M. (1967). Some pharmaceutical applications of ultrasonics. *J. pharma. Sci.*, 56 (11), 1373-1385.
- Smedes, F., Thomasen, T. K. (1996). Evaluation of the Bligh & Dyer lipid determination method. *Mar. Pol. Bull.*, 32 (8/9), 681-688.
- Smedes, F., Askland, T. K. (1999). Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination method. *Mar. Poll. Bull.*, 38 (3), 193-201.

- Sosulski, F., Zasdernowski, R., Babuchowski, K. (1981). Composition of polar lipids in rapeseed. *J.A.O.C.S.*, 561-564.
- Sosulski, F. W. (1983). Rapeseed protein for use. *In Developments in food proteins-2*. Hudson B. F. J. Ed, Applied Science Publishers, Essex, 109-132.
- Sosulski, K., Sosulski, F. W., Coxworth, E. (1988). Carbohydrase hydrolysis of canola to enhance oil extraction with hexane. *J.A.O.C.S.*, 65, 357-361.
- Sosulski, K., Sosulski, F. W. (1990). Enzyme pretreatment to enhance oil extratability. *In Canola and rapeseed, production, chemistry, nutrition and processing technology*, F. Shahidi (Ed.), Elsevier: Amsterdam, 16, 277-289.
- Sousa Jr, R., Lopes, G. P., Tardioli, P. W., Giordano, R. L. C., Almeida, P. I. F., Giordano, R. C. (2004). Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particules. *Brazilian J. Chem. Eng.*, 21 (2), 147-153.
- Splender, T. (1986). Protein osmolality for DH determination. Novo A-06196: 1-7.
- Stratilova E., Breierova E., Vadkertiova R. (1996) Effect of cultivation and storage pH on the production of multiple forms of polygalacturonase by *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett.*, 18, 41-44.
- Steinhardt, J., Beychok, S. (1964). Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions molecules. *In The proteins*, H. Neurath (Ed.), Academic Press: New York, 2, 139-304.
- Subramanian, R., Nakajima, M. (1997). Membrane degumming of crude soybean and rapeseed oils. *J.A.O.C.S.*, 74 (8), 971-975.
- Sugarman, N. (1956). Processing for extraction of oil and protein simultaneously from oil bearing material. *United State Patent*: US2762820.
- Suzuki, T., Komatsu, H., Miyajima, K. (1996). Effects of glucose and its oligomers on the stability of freeze-dried liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1278 (2), 176-182.
- Svendsen, I. (1976). Chemical modifications of the subtilisins with special reference to the binding of large substrates: a review. *Carlsberg Res. Commun.*, 41, 237-291.
- Tadros, T. F. (1989). Colloidal aspects of pesticidal and pharmaceutical formulation: an overview. *Pestic Sci.*, 26, 51-77.
- Tadros, T. F. (2004). Application of rheology for assessment and prediction of the long term physical stability of emulsions. *Adv. Coll. Interfaces Sci.*, 108-109, 227-257.
- Tang, P., Nielsen, G. C., Gibson, K., Aunstrup, K., Schiff, H. (1979). Protease product of reduced allergenicity. *United States Patent*: US4266031.
- Thanasukarn, P., Pongsawatmanit, R., McClements, D. J. (2004). Influence of emulsifier type on freeze-thaw stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.*, 18, 1033-1043.
- Tesch, S., Schubert, H. (2002). Influence of increasing viscosity of the aqueous phase on the short term stability of protein stabilized emulsions. *J. Food Eng.*, 52, 305-312.
- Thiex, N., Richardson, C. R. (2003). Challenges in measuring moisture content of feeds. *J Anim Sci.*, 81(12), 3255-3266.
- Tirok, S., Scherze, I., Muschiolik, G. (2001). Behaviour of formula emulsions containing hydrolysed whey protein and various lecithins. *Coll. Surf. B : Biointerfaces*, 21, 149-162.
- Toyama N. (1969). Applications of cellulases in Japan. *In Cellulases and their applications symposium*, American Chemical Society (ed.), 156th meeting of the American Chemical Society. Atlantic City, N.J., Sept. 11-12 1968, 359-390.

- Truong, L., Phillips, C.R. (1976). Freezing oil-water and oil-saline emulsions. *Environm. Sci. Technol.*, 10 (5), 482-485.
- Tzen, J. T. C., Huang, H. A. C. (1992). Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J. Cell. Biol.*, 117, 327-335.
- Tzen, J. T. C., Lao, Y. Z., Laurent, P., Ratnayake, C., Hung H.A.C. (1993). Lipids, proteins and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiol.*, 101, 267-276.
- Unger, E. H. (1990). Commercial processing of canola and rapeseed: Crushing and oil extraction. In *Canola and rapeseed, production, chemistry, nutrition and processing Technology*, F. Shahidi (Ed.), Avi Book, Van Nostrand Reinhold, New York, 14, 235-249.
- Uruakpa, F. O., Arntfield, S. D. (2005). Emulsifying characteristics of commercial canola protein-hydrocolloid systems. *Food Res. Int.*, 38, 659-672.
- USDA (2004). United states department of agriculture : données économiques 2004.
- Van Aken, G. A., Van Vliet, T. (2002). Flow-induced coalescence in protein stabilized highly concentrated emulsions: role of shear-resisting connections between the droplets, *Langmuir*, 18, 7364–7370.
- Van Aken, G. A., Blijdenstein, T. B. J., Hotrum, N. E. (2003a). Colloidal destabilisation mechanisms in protein-stabilised emulsions. *Curr. Opinion Coll. Interf. Sci.*, 8, 371-379.
- Van Aken, G. A. (2003b). Competitive adsorption of protein surfactants in highly concentrated emulsions: effect on coalescence mechanisms. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 213 (2) , 209-219.
- Van Aken, G. A. (2004). Coalescence mechanisms in protein-stabilized emulsions, In *Food emulsions*, S. Friberg, K. Larsson, J. Sjoblom (Eds.), 4^{ème} Ed., Marcel Dekker, New York, Chap. 8., 299-326.
- Vanapalli, S. A., Palanuwech, J., Coupland, J. N. (2002). Stability of emulsions to dispersed phase crystallization: effect of oil type, dispersed phase volume fraction, and cooling rate. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 204, 227–237.
- Van de Sande, R. K. L. M., Segers, J. C. (1989). Method of refining glyderide oils. Brevet Européen : EP0348004.
- Verwey, E. J. W., Overbeek, J. T. G. (1948). *In Theory of the stability of liophobic colloids*, Elsevier, Amsterdam.
- Vigeolas, H., Van Dongen, J. T., Waldeck, P., Hühn, D., Geigenberger, P. (2003). Lipid storage metabolism is limited by the prevailing low oxygen concentrations within developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiol.*, 133, 2048–2060.
- Vilarem, G., Dumont, V., Gaset, A. (1997). Extraction assistée par ultrasons. *OCL*, 4 (1), 42-45.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of ultrasonically assisted extraction of bioactive principle from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 (3), 303-313.
- Volatier, J. L. coordonnateur (2000). Enquête INCA individuelle et nationale sur les consommations alimentaires, *Tec & Doc*, Paris.
- Vold, R. D., Groot, R. C. (1962). An ultracentrifugal method for the quantitative determination of emulsion stability. *J. Phys. Chem.*, 66, 1969-1975.
- Vorob'ev, M. M., Levicheva, I. Y., Belikov, V. M. (1996). Kinetics of the initial stage of milk protein hydrolysis by chymotrypsin. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 32, 219-222.
- Wakelyn, P. J., Hron, R. J., Flider, F. J., Wan P. J. (2001). Acetone: An environmentally preferable choice for oilseed extraction? *Inform*, 12 (9), 887-893.

- Walsh, K. A., Wilcox, P. E. (1970). Serines proteases. In *Methods in enzymology : proteolytic enzymes*, G.E . Perlmann et L. Lorand (Eds.), New-York, 19-31.
- Walstra, P. (2003). In *Physical Chemistry of Foods*, Marcel Decker, New York.
- Wanasundara, P. K. J. P. D., Shahidi, F. (1997). Removal of flaxseed mucilage by chemical and enzymatic treatments. *Food Chem.*, 59 (1), 47-55.
- Ward-Smith, R. S., Hey, M. J., Mitchell, J. R. (1994). Protein-polysaccharide interactions at the oil-water interface. *Food Hydrocoll.*, 8 (3-4), 309-315.
- Wecker, E. (1924). Procédés pour la separation des substances volatiles des substances lourdes ou non volatiles. *Brevet Français* FR579470.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 108-109, 63-71.
- Xu, W., Nikolov, A., Wasan, D. T., Gonsalves, A., Borwankar, R. P. (2003). Foam film rheology and thickness stability of foam-based food products. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 214, 13-21.
- Yoon, S. H., Kim, I. H., Kwon, T. W. (1991). Effect of enzyme treatments and ultrasonification on extraction yields of lipids of protein from soybean by aqueous process. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 23, 673-676.
- Young, L. G. (1982). Effects of processing on nutritive value of feeds: oilseeds and oilseed meals. In *CRC Handbook of Nutritive Value of Processed Food*, Volume II Animal Feedstuffs, M Recheigl Jr (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 213–221.
- Zouboulis, A. I., Avranas, A. (2000). Treatment of oil in water emulsions by coagulation and dissolved-air flotation. *Coll. and Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 172, 153-161.

Ressources internet :

- Bell, J. M., Hickling, D. (2001). Section II: Composition of canola meal. In : *Canola feed meal industry guide*. <http://www.canola-council.org/pubs/composit.html>
- Przybylski, R. (2001). Canola oil: Physical and chemical properties. In : *canola oil technical information kit*. <http://www.canola-council.org/pubs/physprop.html>

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Michel PINA, Directeur de Recherche, CIRAD, Dépt. PAA.Amis, Montpellier

Monsieur Luc RIGAL, Ingénieur de Recherche, ENSIACET, LCA-CATAR, Toulouse

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame GUILLEMIN Sandrine

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Extraction aqueuse d'huile de colza assistée par hydrolyse enzymatique : optimisation
de la réaction, caractérisation de l'émulsion et étude de procédés de déstabilisation"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 23 octobre 2006

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55